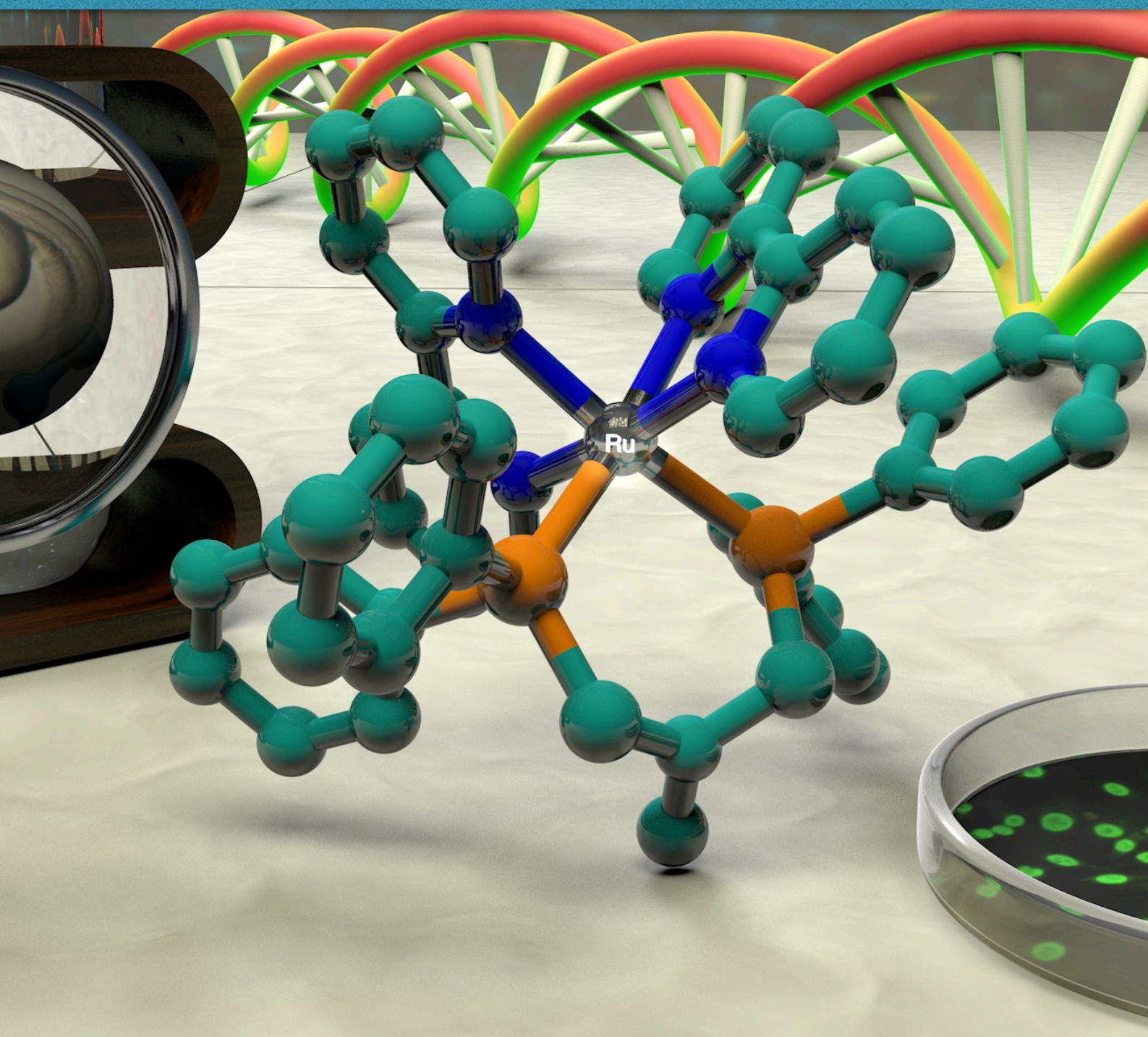


# Diseño y estudio de compuestos de rutenio con actividad biológica



Oscar Armando Lenis Rojas  
A Coruña 2017

---

---



---

# Diseño y estudio de compuestos de rutenio con actividad biológica

Autor: Oscar Armando Lenis Rojas

Tesis doctoral UDC / 2017

---

Directores: Jesús José Fernández Sánchez.

Digna Vázquez García.

Programa Oficial de Doutoramento en  
*Química Ambiental e Fundamental*



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

---

---

---



Memoria presentada en la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña por D. OSCAR ARMANDO LENIS ROJAS para optar al título de Doctor por la universidade da Coruña.

A Coruña 2017.

JESÚS JOSÉ FERNÁNDEZ SÁNCHEZ.

DIGNA VÁZQUEZ GARCÍA

Fdo.: .....

Fdo.: .....

OSCAR ARMANDO LENIS ROJAS

Fdo.: .....

---

---

---



Programa Oficial de Doutoramento en  
*Química Ambiental e Fundamental*

Los Dres. JESÚS JOSÉ FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Catedrático de Universidad, y  
DIGNA VÁZQUEZ GARCÍA, Profesora Titular de Universidad, del Área de Química  
Inorgánica y adscritos al Departamento de Química de la Universidade da Coruña,

INFORMAN

Que el trabajo titulado *“Diseño y Estudio de Compuestos de Rutenio con Actividad  
Biológica”*, presentado por D. OSCAR ARMANDO LENIS ROJAS,, ha sido realizado  
bajo su dirección en el laboratorios del Área de Química Inorgánica en la Facultad de  
Ciencias de A Coruña y el laboratorio Quimolmat 2 del Centro de Investigaciones  
Científicas Avanzadas (CICA) de A Coruña y

AUTORIZAN

Su presentación para optar al Título de Doctor con Mención Internacional por la  
Universidade da Coruña.

Y para que así conste, firman la presente en A Coruña, a        de        de 2017.

Fdo. D. Jesús José Fernández Sánchez.

Fdo. Dña. Digna Vázquez García.

---

---

---





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Programa Oficial de Doutoramento en  
*Química Ambiental e Fundamental*

*Acta de tesis*

El tribunal, nombrado por el Excmo. Sr. Rector de la Universidad de A Coruña para calificar la tesis doctoral titulada "*Diseño y Estudio de Compuestos de Rutenio con Actividad Biológica*", dirigida por los Dres. D. Jesús José Fernández Sánchez y Dña. Digna Vázquez García, y presentada por D. Oscar Armando Lenis Rojas y constituido en el día de la fecha por los miembros que suscriben la presente Acta, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado la calificación de:

En A Coruña, a                      de                      2017.

El presidente,

El secretario,

El vocal,

Fdo.: .....

Fdo.: .....

Fdo.: .....

---





La presente Tesis Doctoral ha sido subvencionada parcialmente con cargo a los proyectos y ayudas de investigación, concedidos por la Xunta de Galicia, **EM2014/056** (Programa de Ayudas para Proyectos de Investigación Desarrollados por Investigadores Emergentes) y **GRC2014/042** (Programa de Grupos de Referencia Competitiva)

---



## **1. Introducción. 1**

**1.1. El cáncer. Desarrollo, tipología y alcance. 2**

**1.2. Tratamiento del cáncer: Quimioterapia y Fármacos antineoplásicos. 9**

**1.3. Metalofármacos de platino en quimioterapia. 17**

**1.4. Metalofármacos de rutenio en quimioterapia. 25**

## **2. Antecedentes y objetivos. 39**

## **3. Parte experimental. 45**

**3.1. Disolventes y reactivos. 46**

*3.1.1. Disolventes. 46*

*3.1.2. Reactivos. 47*

*3.1.3. Gases comprimidos. 48*

**3.2. Técnicas de Caracterización. 49**

*3.2.1. Análisis elemental. 49*

*3.2.2. Espectroscopia de infrarrojo. 49*

*3.2.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. 49*

*3.2.4. Espectrometría de masas. 49*

*3.2.5. Medidas de conductividad. 50*

*3.2.6. Voltametría cíclica. 50*

*3.2.7. Difracción de RX. 50*

*3.2.8. Espectroscopia de ultravioleta visible. 52*

*3.2.9. Espectroscopia de fluorescencia. 53*

*3.2.10. Medidas de pH. 54*

---

3.2.11. Espectroscopia de dicroísmo circular.	54
3.2.12. Cálculos computacionales.	55
3.2.13. Docking molecular.	55
3.2.14. Ensayos de citotoxicidad.	56
3.2.15. Ensayos in vivo en el modelo pez cebra.	57
<b>3.3. Síntesis de los compuestos.</b>	<b>59</b>
3.3.1. Síntesis de los compuestos mononucleares de rutenio derivados de bipyridina.	59
Síntesis del compuesto 1a.	60
Síntesis del compuesto 1b.	61
Síntesis de los compuestos 1c-1e.	62
Síntesis del compuesto 1f.	64
Síntesis del compuesto 1g.	65
Síntesis del compuesto 1h.	67
Síntesis de los compuestos 1i-1j.	68
Esquemas de los compuestos mononucleares de rutenio derivados de bipyridina.	70
3.3.2. Síntesis de los compuestos dinucleares de rutenio derivados de bipyridina.	72
Síntesis del compuesto 1k.	72
Síntesis del compuesto 1l.	73
Síntesis de los compuestos 1m y 1n.	74
Esquema de los compuestos dinucleares de rutenio derivados de bipyridina.	77
3.3.3. Síntesis de los compuestos mononucleares de rutenio derivados de paracimeno.	78
Síntesis del compuesto 2a.	78
Síntesis de los compuestos 2b-2d.	79
Esquema de los compuestos mononucleares de rutenio derivados de paracimeno.	81

---

## **4. Discusión de resultados. 82**

### **4.1 Compuestos mononucleares de rutenio derivados de bipyridina. 83**

*4.1.1. Determinación estructural. 83*

*4.1.2. Estudios antiproliferativos in vitro en líneas de cáncer humano. 98*

*4.1.3. Interacción con DNA. Espectrofotometría de ultravioleta visible y de dicroísmo circular. 104*

*4.1.3.1. Ultravioleta visible. 106*

*4.1.3.2. Dicroísmo circular. 110*

*4.1.4. Estudio computacional de estructura e interacción con el ADN. 112*

*4.1.5. Estudios del mecanismo de muerte celular. 116*

*4.1.6. Toxicidad in vivo en el modelo pez cebra. 122*

### **4.2. Compuestos dinucleares de rutenio derivados de bipyridina. 128**

*4.2.1. Determinación estructural. 128*

*4.2.2. Estudios antiproliferativos in vitro en líneas de cáncer humano. 138*

*4.2.3. Interacción con ADN. Espectrofotometría de UV y de dicroísmo circular. 140*

*4.2.3.2. Ultravioleta visible. 140*

*4.2.3.2. Dicroísmo circular. 142*

*4.2.4. Cálculos computacionales de interacción con ADN. 143*

*4.2.5. Estudios del mecanismo de muerte celular. 145*

*4.2.6. Toxicidad in vivo en el modelo pez cebra. 148*

### **4.3. Compuestos mononucleares de rutenio derivados de paracimeno. 152**

*4.3.1. Determinación estructural. 152*

*4.3.2. Estudios antiproliferativos in vitro en líneas de cáncer humano. 162*

*4.3.3. Estudio de interacción con albúmina por fluorescencia. 164*

*4.3.4. Estudio teórico de interacción con albúmina. 168*

---

*4.3.5. Toxicidad in vivo en el modelo pez cebra.* 172

*4.3.6. Inmunofluorescencia in vivo en el modelo pez cebra.* 175

**5. Conclusiones.** 180

**6. Anexos.** 188

**Anexo I.** 189

**Anexo II.** 197

**Anexo III.** 200

---



Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
ADN	ácido desoxirribonucleico
°C	grado centígrado
d	doblete (RMN) / intensidad débil (IR)
$\delta$	desplazamiento químico
J	constante de acoplamiento
Hz	hercio
ESI	Electro Spray Ionization
equiv.	equivalente
en	etilendiamina
ECP	Effective Core Potential
DFT	Density Functional Theory
$\Delta\delta$	variación en el desplazamiento químico
L	ligando
$\lambda$	longitud de onda
m	multiplete (RMN)/intensidad media (IR)
M	metal/molar
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	singlete
mg	miligramo
MHz	megahercio
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mmol	milimol
m/z	relación masa/carga
nm	nanómetro ( $10^{-9}$ m)
ppm	partes por millón (RMN)

---

t	triplete
IR	infrarrojo
UV	Ultravioleta visible
ARN	ácido ribonucleico
$\Gamma$	gamma
FDA	Food and Drug Administration
Me	metilo
ct-ADN	ADN de timo de ternero
Abs	absorbancia
$\epsilon$	absolutividad molar
g	gramos
HSA	albúmina de suero humana
$\mu\text{M}$	micromolar
S	siemens
hpf	horas por fecundación
RX	rayos x
V	voltios
PCD	Programmed cell death
H	hidrógeno/ Protón
ar	aromático
f	intensidad fuerte (IR)
h	hombro (IR)
Ph	fenilo
ca.	cerca
$\Lambda_{\text{m}}$	conductividad molar
FAB	Fast Atom bombardment

---

O presente projeto trata da síntese e caracterização estrutural de novos compostos de coordenação mono e polinucleares de rutênio derivados de bipyridina, e novos compostos organometálicos mononucleares de rutênio derivados de *p*-cimeno. Também o projecto aborda o estudo das propriedades citotóxicas e a toxicologia *in vivo*, a fim de determinar a aplicabilidade dos compostos como agentes antitumorais.

A determinação estrutural foi realizada por análise elementar, espectrometria de massa, espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ , espectroscopia de IR e UV-Vis, medições de condutividade, voltametria cíclica e difracção de raios-X de monocristal. A continuação testou-se a atividade citotóxica dos compostos em diferentes linhas celulares de câncer humano, sua interação com o DNA como molécula alvo e sua interação com a albumina como sistema de transporte, e além de isso, o mecanismo de morte celular (apoptose e / ou autofagia) foram estudados. O análise da toxicidade *in vivo* dos compostos foi realizada utilizando o modelo de embrião de peixe zebra.

O objetivo geral dos estudos permitiu estabelecer as relações entre a estrutura e o comportamento dos compostos como agentes antineoplásicos. Os resultados indicam que muitos compostos exibem atividade citotóxica semelhante e até superior à cisplatina, com apenas toxicidade em células não tumorais e com baixa ou nenhuma letalidade no modelo de peixe zebra.

O presente proxecto aborda a síntese e caracterización estrutural de novos compostos de coordinación mono e polinucleares de rutenio derivados de bipyridina e novos compostos organometálicos mononucleares de rutenio derivados de *p*-cimeno, e un estudo das propiedades citotóxicas y toxicoloxía *in vivo* co fin de determinar a súa aplicabilidade como axentes antitumorais.

A determinación estrutural levouse a cabo mediante análise elemental, espectrometría de masas, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ , espectroscopia de IR e UV-Vis, medidas de condutividade, voltametría cíclica e difracción de rayos X de monocristal. Estudiouse a actividade citotóxica dos compostos en distintas liñas de cancro humano, a interacción co ADN como molécula diana e a interacción coa albúmina como sistema de transporte, e o mecanismo de morte celular (apoptose e/ou autofaxia). Levouse a cabo o análise da toxicidade *in vivo* dos compostos utilizando o modelo de embrión de pez cebra.

A finalidade global dos estudos realizados permitiu establecer as relacións entre a estrutura e o comportamento dos compostos como axentes antineoplásicos. Os resultados indican que moitos compostos presentan actividade citotóxica similar e incluso superior ó *cis*-platino, con una mínima citotoxicidade en células non tumorais e con baixa ou ningunha letalidade no modelo de pez cebra.

---

This project is based on the synthesis and structural characterization of new mono- and polynuclear coordination compounds of ruthenium derived from bipyridine and new mononuclear organometallic compounds of ruthenium derived from *p*-cymene, and the study of their cytotoxic properties and *in vivo* toxicology in order to determine their applicability as antitumor agents.

The structural determination has been carried out by elemental analysis, mass spectrometry,  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  NMR, UV-Vis and IR spectroscopy, conductivity measurements, cyclic voltammetry and single-crystal X-Ray diffraction. It was evaluated the cytotoxic activity in human cancer cell lines, the interaction with DNA as target molecule and the interaction with albumin as transport system were evaluated. The *in vivo* toxicology was performed using the zebrafish model.

The overall goal of the studies allowed to establish the relationship between the structure and the behaviour of the compounds as antineoplastic agents. The results obtained indicate that the compounds show a similar or even higher cytotoxic activity compared with cis-platinum, a minimum cytotoxicity against non-tumour cells as well as low or no lethality in the zebrafish model.

---

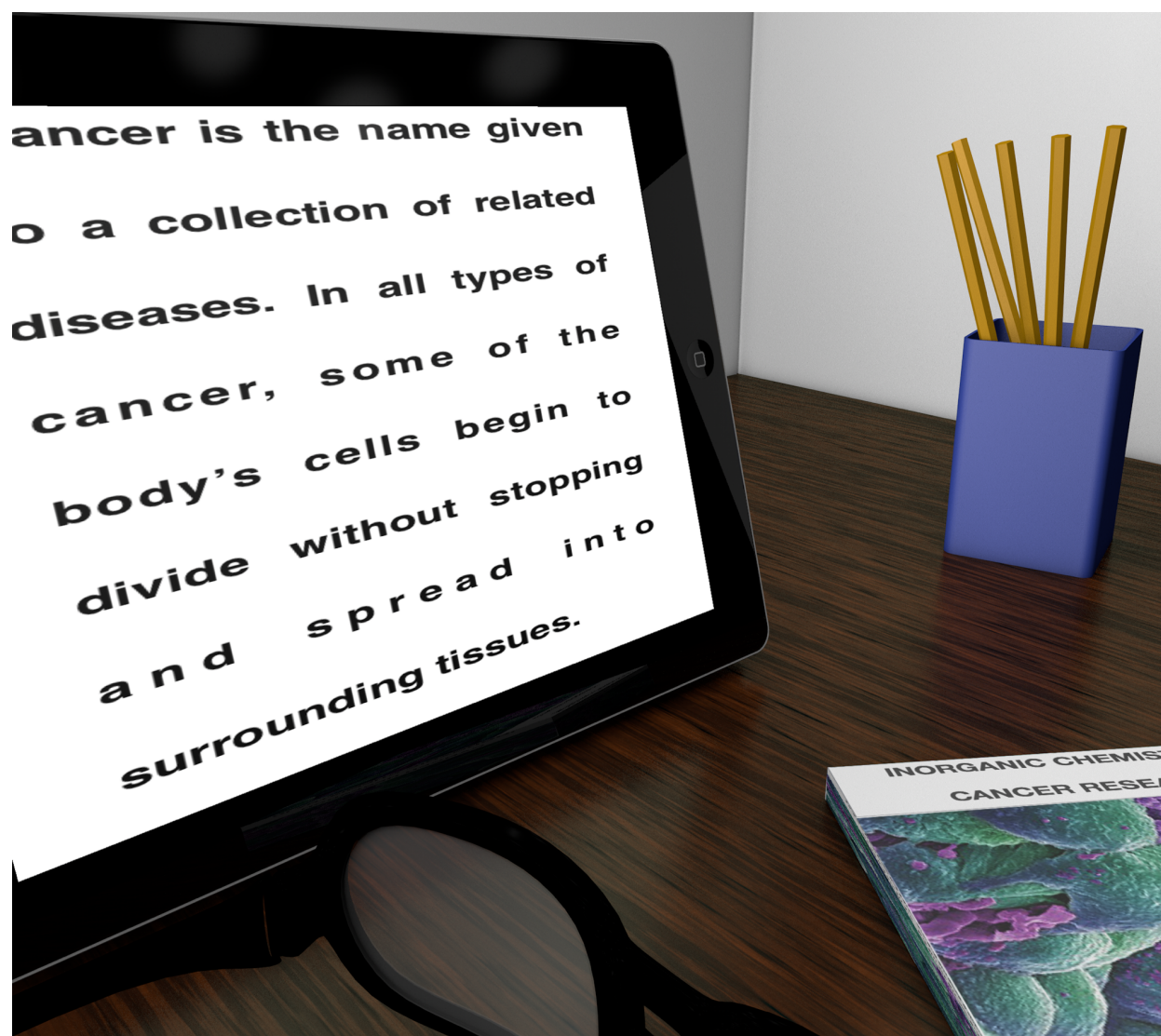
---

---



---

# 1. Introducción.



## 1.1. El cáncer. Desarrollo, tipología y alcance.

El cáncer es un término colectivo utilizado para designar un grupo de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que sufren un proceso de división y crecimiento sin ningún control en cualquier parte del organismo, que invaden, desplazan y destruyen los tejidos sanos.

Todas las células derivan de otras células mediante un proceso conocido como división celular<sup>1</sup>, en el que la célula progenitora sigue una secuencia ordenada de pasos que desembocan en una nueva célula. Dicho proceso es muy complejo y está cuidadosamente controlado por una serie de mecanismos que indican a la célula cuando comenzar a dividirse y cuando permanecer estática: en resumen, la función básica del ciclo celular es la de duplicar de modo exacto el ADN cromosómico, y distribuirlo en células hijas que son genéticamente iguales. Este ciclo tiene un tiempo de duración determinado dependiendo de los distintos tipos celulares existentes, así por ejemplo una célula de embrión de rana en una fase evolutiva temprana puede dividirse cada 30 minutos, mientras que una célula hepática humana lo hace un promedio de una vez al año.

De modo general para una célula eucariota normal podemos decir que el ciclo celular se divide en las siguientes fases:

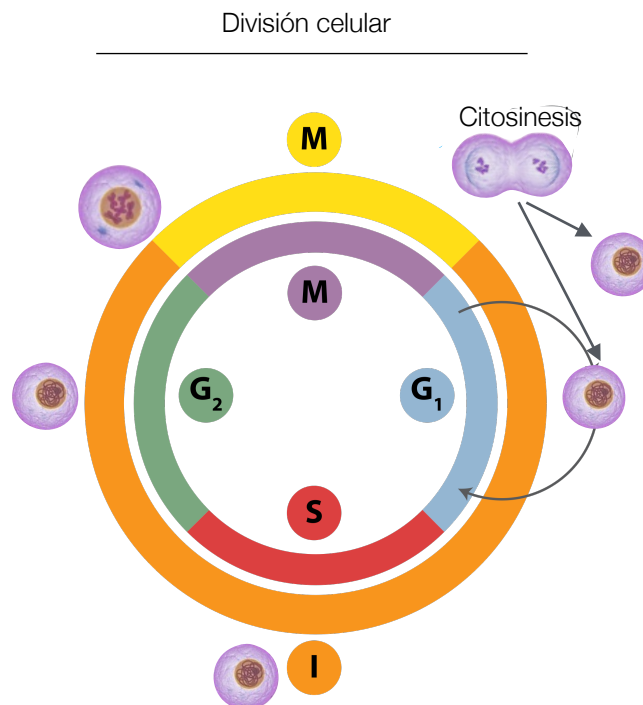
- 1) Fase G<sub>1</sub> (del inglés *gap*, intervalo): en esta etapa se producen las enzimas necesarias para la síntesis del ADN y ARN, así como otras proteínas.
- 2) Fase S (de síntesis): en esta etapa la célula replica prácticamente todo su ADN para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus células hijas.
- 3) Fase G<sub>2</sub>: en esta fase se continúa con la síntesis de proteínas y ARN, y comienza la condensación de los cromosomas preparándose para la división celular.

---

<sup>1</sup> B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, 2006, Introducción a la Biología Celular, Editorial Médica Panamédica, Madrid (España).

- 4) Fase M (Mitosis): en esta fase se lleva a cabo la división del núcleo, lo que se conoce como mitosis, y la célula se divide en dos partes, lo que se conoce como citosinesis. Tiene lugar ya la división física, formándose dos células hijas, entrando de nuevo cada una de ellas en la fase  $G_1$ .

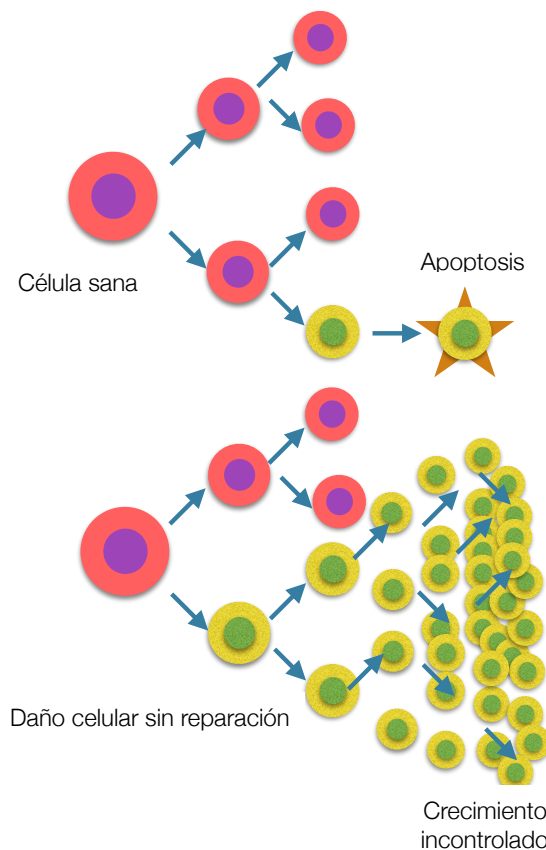
La fase  $G_1$  está en equilibrio con la fase denominada fase  $G_0$ , que es un estado en el cual las células abandonan el ciclo celular y entran en un periodo de reposo, aunque éstas células siguen teniendo un metabolismo activo, de modo que si reciben el estímulo adecuado abandonan el estado  $G_0$  y entran al  $G_1$ .



*Figura 1. Ciclo celular de una célula eucariota dividido en cuatro fases. En la interfase (I), dividida a su vez en tres fases, se lleva a cabo la transcripción de los genes, síntesis de proteínas y el crecimiento de la masa celular.*

Las células normales se dividen de forma controlada y mueren en un período de tiempo programado, de hecho cuando ocurre algún error la célula normal dispone de mecanismos de control para repararlo, y en el caso de no poderse reparar ésta activa su propia muerte, proceso conocido como apoptosis: es decir, durante el ciclo celular hay un equilibrio entre mitosis y apoptosis que regula la población celular de los tejidos. En

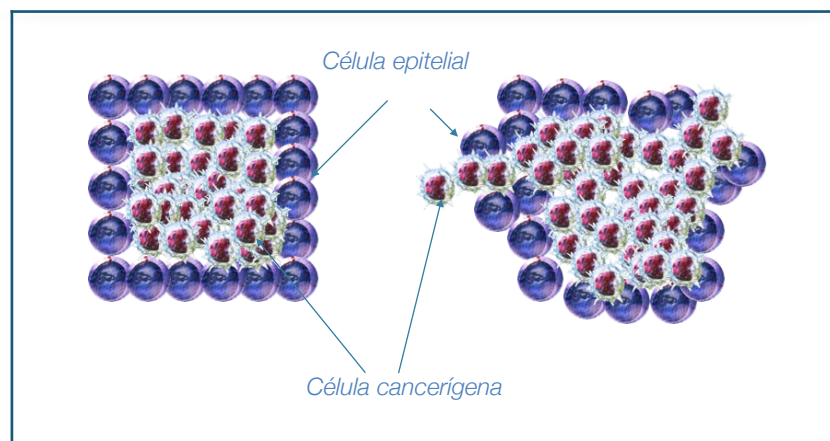
el caso de las células cancerosas el ciclo celular es cualitativamente el mismo que el de una célula normal, sin embargo puede ocurrir que los mecanismos que controlan la división celular se alteren desarrollando mutaciones que no se pueden reparar, y éstas y sus descendientes inician una división celular incontrolada olvidando la capacidad para morir, de modo que dicha división celular incontrolada da lugar a neoplasias.



*Figura 2. Representación de la división celular normal en células sanas (arriba) y crecimiento descontrolado en células cancerosas (abajo).*

Las neoplasias son masas anormales de tejido que crecen de forma incontrolada, excesiva, autónoma e irreversible, superando a los tejidos normales en velocidad de crecimiento e inclusive esta proliferación de células persiste tras la desaparición del estímulo que la desencadenó y no son totalmente independientes, ya que dependen del huésped para nutrirse e irrigarse. Así, las células de tejidos normales compiten con las neoplasias para satisfacer sus necesidades metabólicas.

La oncología, ciencia que estudia los tumores, diferencia las neoplasias en benignas o malignas según el comportamiento clínico que posean. Los tumores benignos, como una verruga común de la piel, son aquellos cuyas características microscópicas y macroscópicas no son graves, es decir, el tumor se encuentra en una zona bien localizada y se puede curar mediante una extirpación quirúrgica. En cambio, los tumores malignos son aquellos que se pueden infiltrar en estructuras adyacentes destruyéndolas, o propagarse a lugares lejanos dando lugar a implantes secundarios (metástasis) y a la formación de masas que se expanden, destruyendo y sustituyendo los tejidos normales.



*Figura 3. Izquierda: un tumor benigno en el que las células cancerígenas están confinadas. Derecha: un tumor maligno cuyas células cancerígenas pueden invadir tejidos adyacentes.*

Con respecto a la nomenclatura, el nombre de los tumores benignos se forma añadiendo el sufijo -oma al tipo de células de las que procede. Por ejemplo el lipoma es un tumor benigno en el tejido adiposo. Sin embargo, aunque el melanoma y el linfoma presenten una nomenclatura parecida a la de los tumores benignos, los tumores malignos o cáncer se nombran por lo general con el sufijo -sarcoma o carcinoma. Así el cáncer desarrollado en el tejido óseo se denomina osteosarcoma.

Dado que el proceso de neoplasias malignas se puede iniciar en cualquiera de los diferentes tejidos que forman parte de nuestro cuerpo hay más de un centenar de

diferentes tipos de cáncer, que pueden variar sustancialmente en su comportamiento y en la respuesta a los tratamientos empleados para la curación de dicha enfermedad.

Se pueden clasificar la mayoría de los tipos de cáncer en los siguientes grupos, en función del tejido en el que se originó:

- ✎ Los carcinomas son enfermedades malignas de las células epiteliales, las cuales conforman el tejido epitelial que recubre y mantiene los órganos protegidos del exterior, evitando infecciones, bacterias o la entrada de virus. Estas células epiteliales son abundantes en el revestimiento de la piel, las glándulas, en los alveolos pulmonares, en el intestino, vagina y útero. Los carcinomas incluyen aproximadamente el 90% de los cánceres humanos, en donde las variedades más comunes son el cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, páncreas y estómago.
- ✎ Los sarcomas son cánceres que se desarrollan a partir de los tejidos conectivos o conjuntivos, a partir de los que se desarrollan los músculos, huesos, cartílagos o tejido graso. El más común es el osteosarcoma, cáncer de hueso.
- ✎ Las leucemias y los linfomas, que representan aproximadamente el 8% de los tumores malignos humanos. Las primeras surgen en las células que forman la sangre y las segundas se desarrollan a partir del tejido linfático, presente en los órganos linfáticos y ganglios.

Son muchos los factores que pueden afectar a la probabilidad de que el cáncer se desarrolle, ya que existen muchos agentes con participación activa en los procesos tumorigénicos, tales como algunos productos químicos, algunos virus o la radiación entre otros<sup>2</sup>, sin contar los cánceres hereditarios originados por la presencia de algún gen anormal que se transmite de una generación a la otra<sup>3</sup>. Por ejemplo, el humo del tabaco contiene sustancias químicas que son carcinogénicas como son la nicotina, el

---

<sup>2</sup> S. Wu, S. Powers, W. Zhu, Y. A. Hannun. *Nature*. **2016**, 529, 43.

<sup>3</sup> R. Nagy, K. Sweet, C. Eng. *Oncogene*. **2004**, 23, 6445.

cianuro, el benceno, etc., de modo que fumar es una causa importante en el desarrollo de cáncer. Algunos virus pueden influir en el desarrollo de cánceres humanos comunes, como es el caso del carcinoma cervical causado principalmente por el virus del papiloma humano. La sobreexposición a la radiación solar por ejemplo es un factor importante en el desarrollo de cáncer de piel<sup>4</sup>. La radiación ionizante, que proviene de elementos radiactivos, es una radiación de alta energía que puede causar alteraciones en el material genético de las células e inducir cáncer. En 1986 ocurrió el accidente de la planta nuclear de Chernobyl en Ucrania que liberó una peligrosa cantidad de material radiactivo que causó, entre otros efectos negativos en la población, una alta incidencia en el cáncer de tiroides y leucemia<sup>5</sup>.

Otros agentes carcinogénicos que pueden ser importantes promotores de tumores son las hormonas, en particular los estrógenos, los cuales estimulan el crecimiento de las células mamarias y del endometrio uterino, por lo que una exposición prolongada a un exceso de estrógeno aumenta significativamente la probabilidad de que una mujer desarrolle cáncer de endometrio o de mama.

En el año 2015 hubo 17.5 millones de casos de cáncer en todo el mundo y 8.7 millones de muertes por causa del mismo, de modo que resulta ser la segunda causa de muerte a nivel mundial<sup>6,7,8</sup> después de las enfermedades cardiovasculares.

La incidencia de los distintos tipos de cáncer varían dependiendo del sexo. Datos referidos al año 2015 indican que en el caso de los hombres las causas más comunes de muerte por cáncer fueron debidas al cáncer que se desarrolla en la zona traqueal-bronquial - pulmonar , hígado y estómago. El cáncer de mama fue la mayor causa de

---

<sup>4</sup> J. D'Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, T. Scott. *Int J Mol Sci.* **2013**, 14, 12222.

<sup>5</sup> [http://www.who.int/ionizing\\_radiation/chernobyl/background/en/](http://www.who.int/ionizing_radiation/chernobyl/background/en/)

<sup>6</sup> Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013. *Lancet.* **2015**.

<sup>7</sup> R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman. *et al. Lancet.* **2012**, 380, 2095.

<sup>8</sup> C.J. Murray, AD. Lopez. *Lancet.* **1997**, 349, 1269.



muerte entre las mujeres, seguido del cáncer que se desarrolla en la zona traqueal-bronquial - pulmonar y colorrectal.

Es importante destacar que a nivel mundial se aprecia una tendencia que sitúa a los países desarrollados como las regiones donde hay una mayor incidencia en el desarrollo de esta enfermedad, produciéndose el 44% de todos los nuevos casos de cáncer y el 34% de todas las muertes con un importante incremento del cáncer en los últimos años<sup>9</sup>. En España, desde el punto de vista epidemiológico, una de cada dos personas nacidas en la actualidad tendrá un cáncer a lo largo de su vida<sup>10</sup> lo que plantea un enorme reto a todos los niveles, entre los que la investigación destaca por su importante papel en el tratamiento de esta dolencia.

Por lo tanto el aumento de cáncer en todo el mundo es un gran obstáculo para el desarrollo humano y es necesaria una acción inmediata para hacer frente a este desastre humano, que toca todas las comunidades en todo el mundo, sin excepción <sup>11</sup>.

---

<sup>9</sup> Global Burden of Cancer 2015. *JAMA Oncol.* **2016**.

<sup>10</sup> Un año de avances en oncología. *Sociedad Española de Oncología Médica.* **2015**. [http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/avances\\_cancer\\_2015.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/avances_cancer_2015.pdf)

<sup>11</sup> B. Stewart and C. P. Wild. (Eds), *World Cancer Report* **2014**.



## 1.2. Tratamiento del cáncer: Quimioterapia y Fármacos antineoplásicos.

Los avances científicos y tecnológicos de los últimos años han supuesto una mejora en los diagnósticos, los tratamientos de la enfermedad y una disminución de los efectos secundarios derivados de dichos tratamientos. El tipo de tratamiento que recibe una persona depende del tipo de cáncer, de cuanto y como se ha expandido, la edad, así como otras dolencias y tratamientos médicos que la persona haya tenido.

Cuando el paciente presenta un tumor sólido, la cirugía es a menudo la primera opción de tratamiento si dicho tumor puede ser extirpado, sin embargo a veces solo es posible extirpar parte del mismo. En muchos casos la existencia de metástasis implica la necesidad de combinar la cirugía con otras terapias como son la radioterapia, hormonoterapia o quimioterapia.

La radioterapia se emplea preferentemente en tumores localizados, y en algunos tipos de cáncer testiculares y linfomas. El tratamiento se lleva a cabo irradiando las células tumorales con radiación de alta energía (como por ejemplo rayos  $X$  o rayos  $\Gamma$ ), de modo que se ve dañado su material genético, haciendo imposible que crezcan y se dividan. La radiación puede provenir de fuera del cuerpo (radiación externa) o de materiales radiactivos colocados directamente en el tumor (radiación interna o de implante), por ejemplo isótopos de cesio-137, cobalto-60, iridio-192 y rutenio-106.

Hay determinados tipos de tumores que presentan receptores hormonales en sus células, y la presencia de hormonas favorece su crecimiento, como es el caso de algunos tumores de cáncer de mama, endometrio, próstata y tumores neuroendocrinos, son los denominados tumores hormodependientes. Este tipo de cánceres son susceptibles de ser tratados mediante hormonoterapia, también conocido como tratamiento hormonal, que emplea un determinado tipo de fármacos que actúan sobre

las hormonas, evitando la síntesis de éstas o modificando los efectos que producen sobre determinadas células, evitando así el crecimiento de tumores.

El término quimioterapia de manera genérica se refiere al tratamiento de las enfermedades mediante el uso de productos químicos denominados comúnmente fármacos antineoplásicos, que tienen como objetivo impedir la reproducción de las células cancerosas<sup>12</sup>.

La mayor parte de los fármacos antineoplásicos que se emplean en la actualidad ejercen principalmente su efecto sobre la división celular y el crecimiento del tumor. El problema de esto radica en que tanto las células normales como las cancerosas tienen mecanismos de reproducción similares, de modo que el efecto tóxico ejercido por dichos fármacos se lleva a cabo de igual modo sobre ambos tipos de células. Por lo que el principal objetivo a la hora de emplear un fármaco, es que este inhiba o frene el crecimiento de las células cancerosas, ejerciendo el mínimo efecto tóxico sobre el paciente.

A nivel celular la inhibición de la reproducción celular y del crecimiento tumoral puede tener lugar en diferentes etapas:

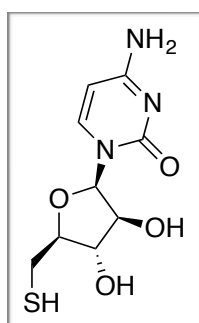
- Sobre la síntesis y la función de las macromoléculas como por ejemplo proteínas, o el ADN o ARN que son los encargados de indicar a la célula como replicarse, de modo que una vez dañados, la célula no puede dividirse y muere.
- Sobre el proceso de organización citoplasmática.
- En la síntesis y función de la membrana celular.
- O sobre el entorno de la célula cancerosa que se encuentra en fase de crecimiento.

---

<sup>12</sup> Roland T. Skeel, 2000, Quimioterapia del Cáncer, Marbán Libros, Madrid (España).

La clasificación de los fármacos antineoplásicos se puede hacer en función de en qué etapa del ciclo celular estén ejerciendo su actividad sobre las células. Hay algunos fármacos que actúan en las células que se encuentran en fases específicas del ciclo celular, otros actúan en cualquier fase del ciclo, e incluso hay algunos que son activos tanto si las células están en la fase de reposo  $G_0$  o en el ciclo.

Los fármacos específicos de fase son más activos cuando la célula se encuentra en una determinada fase del ciclo celular; pueden actuar en la fase  $G_1$ , en la fase S, la fase  $G_2$  o en la fase M. Este tipo de fármacos presenta la limitación de que solamente morirán aquellas células que se encuentren en la fase donde el fármaco tiene efecto. Por ello, para la destrucción de células en una mayor proporción se requiere una exposición prolongada o dosis repetidas del fármaco. Un ejemplo de fármaco específico de fase es la citarabina, que actúa inhibiendo la síntesis de ADN y por consiguiente solo es activo durante la fase S (figura 4).



*Figura 4. Citarabina, fármaco quimioterapéutico específico de fase.*

A diferencia de los fármacos específicos de fase, los fármacos denominados específicos de ciclo celular son activos independientemente de la fase en la que se encuentre la célula, aunque es posible que los fármacos incluidos en este grupo presenten mayor actividad en una fase concreta, pero no hasta el grado que muestran los específicos de dicha fase. Como ejemplo de fármacos específicos de ciclo celular se encuentran el busulfan y el *cis*-platino (figura 5).

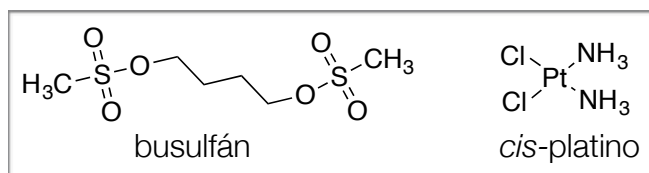


Figura 5. Fármacos quimioterapéuticos específicos de ciclo celular.

Por último, los compuestos que actúan tanto si la célula está en ciclo como en reposo se denominan fármacos no específicos del ciclo celular. En este aspecto el tratamiento con este tipo de compuestos es similar al tratamiento con radioterapia, es decir, ambos tratamientos son eficaces independientemente de si la célula está en ciclo o no. Como ejemplo de un agente que pertenece a este grupo es la carmustina (figura 6)

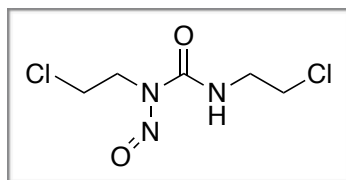


Figura 6. Carmustina, fármaco quimioterapéutico no específico de ciclo celular.

Los fármacos antineoplásicos se pueden clasificar también en varios grupos en función de su mecanismo de acción, su estructura y la relación que presenten con otros fármacos. Así, pueden clasificarse en agentes alquilantes, antimetabolitos, fijadores de la tubulina, inhibidores de la topoisomerasa y los antibióticos citotóxicos<sup>13,10</sup>. Hay que destacar que algunos fármacos pueden presentar más de un mecanismo de acción, por lo que podrían pertenecer a varios grupos.

La actividad de los agentes alquilantes se basa en la capacidad para formar enlaces covalentes con los grupos amino, carboxilo, fosfato o sulfhidrilo de macromoléculas como por ejemplo el ADN, de modo que se lleva a cabo una alteración tal que le es imposible replicarse y en consecuencia se produce la muerte celular. Estos fármacos ejercen su mecanismo de acción en todas las fases del ciclo celular. Como

<sup>13</sup> T. Priestman, 2008, Cancer chemotherapy in clinical practice, Springer, London (United kingdom).

agentes alquilantes destacan las mostazas nitrogenadas (como es el caso de la ciclofosfamida) que producen intermediarios de ión carbonio, el cual resulta ser muy reactivo y puede interaccionar con las zonas ricas en electrones de las moléculas diana.

Las sales metálicas de platino, como el *cis*-platino, carboplatino y oxalilplatino, se incluyen dentro de la categoría de los agentes alquilantes, debido a que su mecanismo de acción es similar, ya que inhiben la síntesis del ADN.

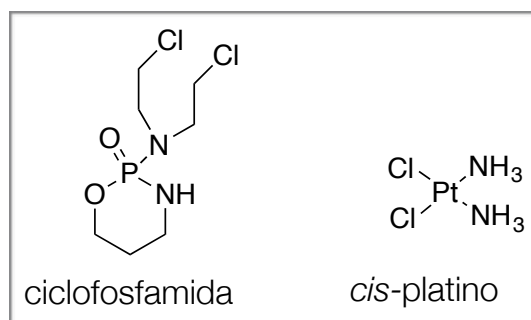
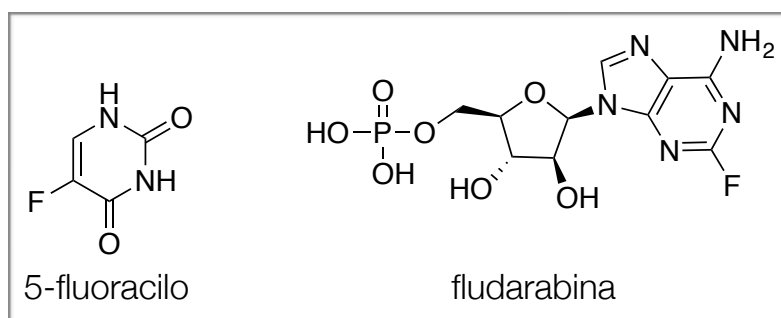


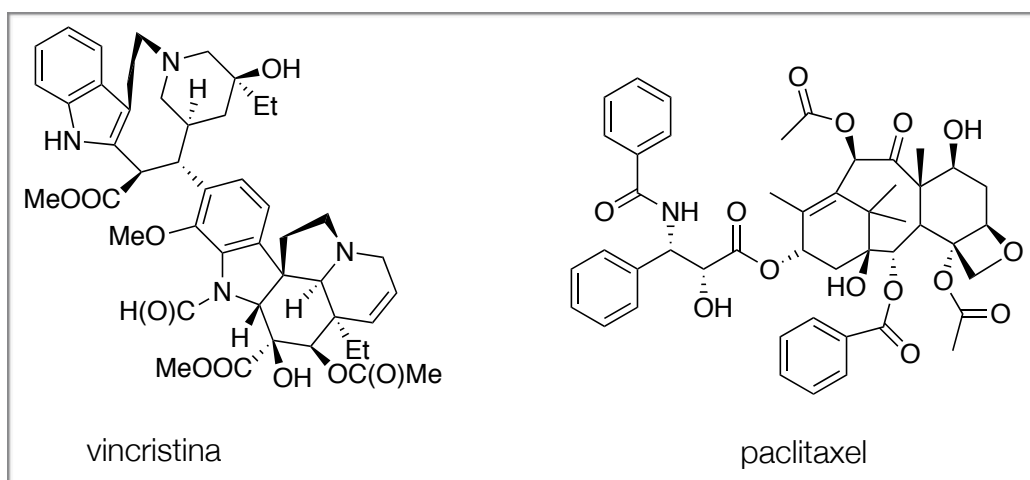
Figura 7. Fármacos quimioterapéuticos alquilantes.

Los antimetabolitos presentan una semejanza estructural o de mecanismo de acción con los metabolitos naturales que actúan en la fase del ciclo celular donde se produce la síntesis del ADN y el ARN, por lo que son fármacos específicos de la fase S del ciclo celular. Al interaccionar con las células éstas los confunden con los metabolitos naturales, de modo que o bien interaccionan con las enzimas que controlan el proceso de síntesis del ADN inhibiéndolas, o interaccionan con el ADN directamente alterando la información genética. Como ejemplo de este tipo de compuestos destacan el fluorouracilo (o 5-FU) y la fludarabina (figura 8).



*Figura 8. Fármacos quimioterapéuticos antimetabolitos.*

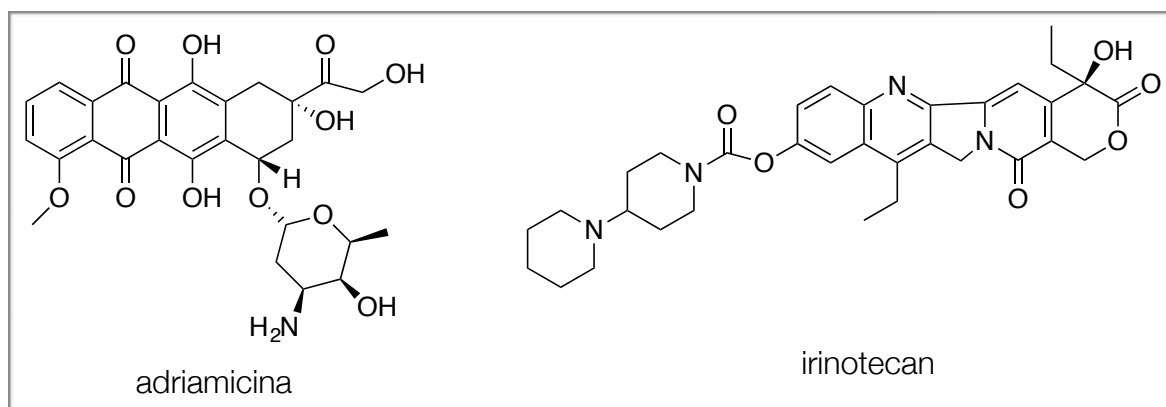
Los agentes que interactúan con los microtúbulos (polímeros proteicos que están presentes en el citoplasma de las células y que son vitales para su viabilidad, ya que participan activamente en los procesos previos a la división celular) interaccionan con ellos en la fase M del ciclo celular y como ejemplos de este tipo de fármacos están la vincristina y el paclitaxel (figura 9).



*Figura 9. Fármacos quimioterapéuticos que interactúan con los microtúbulos.*

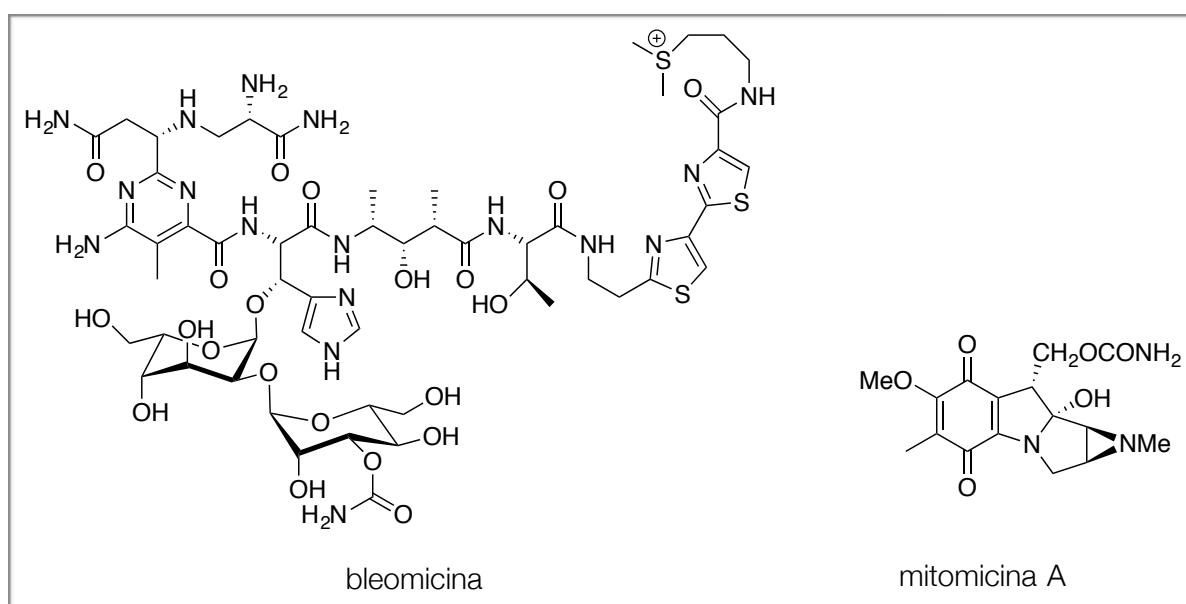
Los inhibidores de las topoisomerasas (enzimas que desempeñan un papel fundamental en los procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN) bloquean dichas enzimas alterando el ADN. Estos fármacos actúan en la fase S y G<sub>1</sub>

del ciclo celular, y se incluyen en este grupo por ejemplo la adriamicina, y el irinotecan (figura 10).



*Figura 10. Fármacos quimioterapéuticos inhibidores de las topoisomerasas.*

Los antibióticos antitumorales constituyen un grupo de compuestos relacionados con los compuestos antimicrobianos, aunque su toxicidad conlleva a que se limite su uso como tal, se emplean en el tratamiento contra diversos tipos de cáncer como por ejemplo el cáncer de pulmon. Intervienen en los procesos de síntesis y función de los ácidos nucleicos, y son fármacos de fase inespecíficos. Como ejemplos destacan la bleomicina y la mitomicina (figura 11)



*Figura 11. Agentes antibióticos citotóxicos.*





### 1.3. Metalofármacos de platino en quimioterapia.

Una gran parte de los fármacos empleados en quimioterapia son complejos de platino. El platino<sup>14</sup> fue incorporado al tratamiento antineoplásico debido al descubrimiento fortuito del Prof. Barnet Rosenberg en el año 1965<sup>15</sup>. Rosenberg investigaba los efectos que ejercían los campos eléctricos sobre cultivos de bacterias, y sorprendentemente encontró que con las descargas eléctricas la *Escherichia coli* (bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de otros animales) formaba largos filamentos en vez de dividirse, lo que indicaba que había perdido la capacidad de replicación de su ADN, aunque la síntesis de ARN y proteínas todavía seguía activa. Finalmente descubrió que dicho efecto no era causado por las descargas eléctricas, sino por una serie de compuestos que se formaban a partir del platino del electrodo que se encontraba sumergido en una disolución de cloruro amónico del medio de cultivo.

A partir de este descubrimiento se abrió una nueva investigación de complejos neutros de platino como agentes antitumorales del que destacó el *cis*-diclorodiaminoplatino(II), conocido como *cis*-platino, que a partir de 1978 comenzó a comercializarse en los Estados Unidos con el nombre de Platinol, y en 1979 en Gran Bretaña como Neoplatin, para el tratamiento del cáncer de testículos y de ovario.

El *cis*-platino es un complejo de geometría plano cuadrada y sin carga, que puede atravesar las membranas celulares. En el interior de la célula la concentración de iones cloruro es menor que en el medio extracelular, de modo que cuando el complejo atraviesa la membrana celular y llega al interior, se produce la hidrólisis de los enlaces Pt-Cl del complejo, en donde los ligandos cloro se ven desplazados fácilmente por ligandos agua, formándose una especie electrófila cargada positivamente<sup>16</sup>.

---

<sup>14</sup> X. Kang, H. Xiao, H. Song, X. Jing, L. Yan. Qi. *Cancer Biol Med.* **2015**, 4, 363.

<sup>15</sup> B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas. *Nature.* **1965**, 205, 698.

<sup>16</sup> C. Avendaño López, Introducción a la química farmacéutica, **2001**, McGrawHill, Madrid (España).

Como hemos comentado anteriormente, el *cis*-platino se encuadra dentro los fármacos alquilantes en base a su mecanismo de acción, debido a que forma aductos con el ADN alterándolo y evitando que este se replique, lo que causa finalmente la muerte celular.

Una vez dentro de la célula la especie activa, que con gran probabilidad será el *cis*-diacuodiaminoplatino(II), interacciona con las bases nitrogenadas del ADN que actúan como ligandos nucleófilos, llevándose a cabo una interacción electrostática que coloca al complejo en las proximidades del ADN, y a continuación el platino, que es un ácido blando, puede coordinar bien con los átomos de oxígeno de los grupos polifosfato o con los átomos de oxígeno o nitrógeno de las bases nucleicas (en concreto entre el N1 y N7 de la adenina, el N7 de la guanina, o el N3 de la citosina).

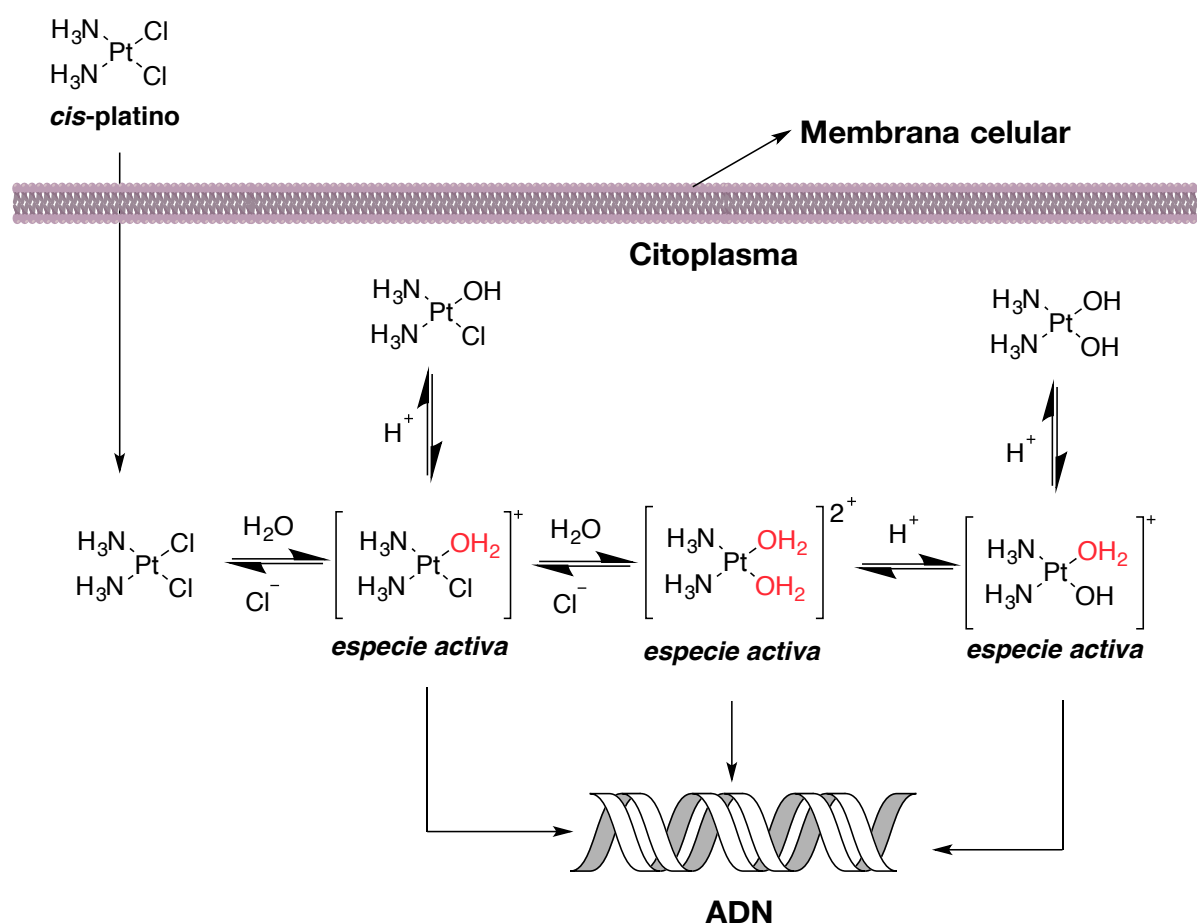


Figura 12. Esquema de las reacciones de hidrólisis que dan lugar a las especies reactivas del *cis*-platino.

Los estudios realizados han mostrado que los aductos que se forman mayoritariamente entre el *cis*-platino y el ADN son aquellos que se establecen entre el complejo y el nitrógeno 7 de dos guaninas contiguas dentro de la misma cadena de ADN (figura 13, estructura **a**, 60 % de abundancia relativa), o entre una guanina y una adenina adyacentes (figura 13, estructura **b**, 25 % de abundancia relativa), incluso se forman aductos entre el platino con el N7 de dos guaninas que tienen otra base entre ellas (figura 13, estructura **c**), o entre dos guaninas de dos hebras de ADN complementarias (figura 13, estructura **d**)<sup>17,18</sup>.

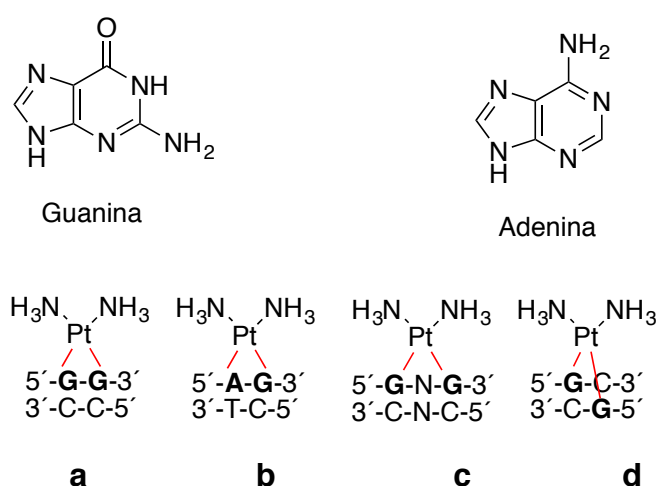


Figura 13. Principales aductos que forma el *cis*-platino con una hebra de ADN.

En el caso del *cis*-platino las interacciones mayoritarias se producen con las bases nitrogenadas de una de las hebras del ADN, lo contrario que ocurre con otros agentes alquilantes, como son las mostazas nitrogenadas, que pueden coordinarse a las bases nitrogenadas de dos hebras de la hélice de ADN, debido a que en este caso las distancias entre los centros electrófilos que interaccionan con el ADN son mayores que en el caso del *cis*-platino<sup>14</sup>. La formación de estos aductos causa una distorsión en la doble hélice del ADN interrumpiendo los procesos en los que éste participa. Cuando el

<sup>17</sup> W. Kaim, B. Schwederski, Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life. An introduction and guide, 1999, John Wiley & Sons, Chichester (England).

<sup>18</sup> K. Nakamoto, M. Tsuboi, Gari D. Strahan, Drug-DNA interactions. Structure and Spectra, 2008, John Wiley & Sons, New Jersey (United States of America).

daño causado es tal que los mecanismos de reparación presentes en las células no pueden subsanarlo, se produce la muerte celular que, generalmente, ocurre por apoptosis. Sin embargo el *cis*-platino es una especie muy tóxica que se acumula principalmente en el riñón e hígado, y produce efectos secundarios como pueden ser neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, náuseas, vómitos, alopecia, así como la pérdida gradual del sentido auditivo entre otras. Estos problemas de toxicidad, junto con el hecho de que no todos los tipos de cáncer responden al tratamiento con este fármaco, y otros incluso se acababan volviendo inmunes desarrollando una resistencia al mismo a lo largo del tratamiento, abrió un campo de investigación para buscar nuevos complejos de platino de menor toxicidad y resistencia, y que tuvieran la posibilidad de poder administrarse por vía oral (el *cis*-platino se administra vía intravenosa), de modo que debían ser más solubles en agua, y presentar una mayor actividad frente a un espectro más amplio sobre los diferentes tipos de cáncer existentes.

Teniendo en cuenta el mecanismo de acción del *cis*-platino, las investigaciones se centraron en la búsqueda de especies de platino que presentaran una estructura similar, y en las que los ligandos amino se reemplazaran por otros ligandos nitrogenados.

Surgieron entonces durante las décadas de 1970 y 1980 nuevos fármacos de platino denominados de segunda y tercera generación, cuyos ensayos clínicos mostraron que presentaban una menor neurotoxicidad y resultaron efectivos en tratamientos anticancerígenos. Dentro de esta familia de compuestos, aprobados a nivel mundial para su uso en quimioterapia, destacan el carboplatino y el oxalilplatino.

El carboplatino (figura 14), aprobado por la FDA en 1989 y comercializado bajo el nombre de Paraplatino, fue el primer fármaco de platino de segunda generación.

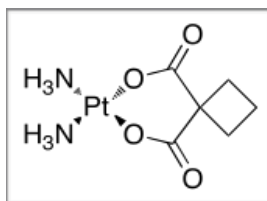


Figura 14. 1,1'-ciclobutanodicarboxilatodiamminoplatino(II)  $[Pt(NH_3)_2(CBDCA)]$ , "Carboplatino".

Desde el punto de vista estructural el carboplatino difiere del *cis*-platino en la incorporación del ligando quelatante ciclobutildicarboxilato en lugar de los dos cloruros presentes en el *cis*-platino. Dicho ligando quelato resulta ser menos lábil que los ligandos cloro, por lo que los procesos de hidrólisis son más lentos, evitando que el fármaco actúe en el medio extracelular. El mecanismo de acción es muy similar al del *cis*-platino, aunque los aductos que se forman con el ADN no están en la misma proporción que en el caso de éste, siendo mayoritario para el carboplatino la formación del aducto entre el centro metálico y dos guaninas de una misma cadena que tienen una base entre ellas (36%), seguido de los aductos formados con dos guaninas contiguas de la misma hebra (30%) y con una guanina y adenina adyacentes (16%)<sup>16</sup>.

Este fármaco se emplea en el tratamiento de carcinomas de ovario, pulmón, cabeza y cuello. Es interesante destacar que el carboplatino tiene menos efectos secundarios, además los pacientes toleran el carboplatino en mayor medida que el *cis*-platino por lo que es posible emplearlo en dosis altas en caso de ser necesario, sin embargo no puede administrarse oralmente.

El oxaliplatino (figura 15), de nombre comercial Eloxatin y aprobado por la FDA en 2002, es un compuesto de platino de tercera generación que contiene en su estructura dos ligandos quelato, el 1,2-diaminaciclohexano (DACH) y un ligando oxalato.

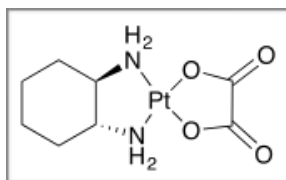


Figura 15. Oxalato (1*R*,2*R*-ciclohexanodiamina) de platino(II),  $[Pt(C_2O_4)(DACH)]$ , "Oxaliplatino".

La presencia del ligando quelatante 1,2-diaminaciclohexano en lugar de los dos ligandos amina le proporciona al oxaliplatino un comportamiento distinto al carboplatino y al *cis*-platino, debido a que, entre otros factores, los grupos amina le permiten una mayor estabilización del aducto Pt-ADN mediante los enlaces de hidrógeno que puede formar el oxígeno 6 de las guaninas<sup>19,20</sup>. El mecanismo de acción de este fármaco de nuevo es similar al del *cis*-platino, formando aductos con el N7 de dos guaninas contiguas por desplazamiento de los dos átomos de oxígeno del ligando quelato oxalato. El hecho de que el ligando 1,2-diaminaciclohexano tenga dos centros quirales, hace que este complejo de platino presente tres estereoisómeros activos (*R,R*, *S,S*, *R,S*)<sup>16</sup>.

El oxaliplatino es el primer fármaco de platino que ha sido capaz de superar la resistencia de las células tratadas con *cis*-platino y además exhibe una actividad antitumoral mayor con diversas líneas celulares de cáncer de colon que sus predecesores, el *cis*-platino y el carboplatino.

En los últimos años ha suscitado interés la síntesis de compuestos de Pt(IV), en los que el centro metálico resulta ser más inerte que los de Pt(II) y su toxicidad es menor. En esta línea destaca un fármaco empleado en el tratamiento antineoplásico, en fase de ensayos clínicos de cáncer de próstata, conocido como Satraplatino o JM216 (figura 16). Esta especie es un complejo de platino(IV) que presenta en su estructura,

<sup>19</sup> N. Hadjiladis, E. Sletten, Metal Complex–DNA Interactions, **2009**, Willey, West Sussex (United Kingdom).

<sup>20</sup> B. Spingler, D. A. Whittington, S. J. Lippard. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 5596.

además de los ligandos cloro, un grupo amina y un grupo ciclohexilamina y dos ligando acetato en posición *trans*, ligandos que hacen que en conjunto el satraplatino sea más lipófilo lo que incrementa su biodisponibilidad<sup>21</sup>. Estos grupos se metabolizan *in vivo* para dar lugar a la especie activa JM118, que resulta ser un derivado de platino (II)<sup>14</sup>.

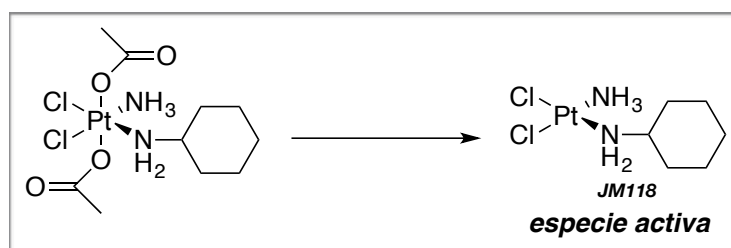


Figura 16. Transformación del [Bis (acetato) aminodicloro (ciclohexilamina) platino(IV)], "Satraplatino" en su correspondiente especie activa.

Los complejos de platino (IV), tienen un enorme potencial como agentes anticancerígenos en términos tanto de alta actividad como de baja toxicidad. Estas ventajas potenciales de los complejos de platino(IV), que permanecen como tal en el torrente sanguíneo, se basan en que son menos reactivos lo que deriva en una menor tasa de unión a macromoléculas. Esto hace que se limite la pérdida de fármaco activo y por otra parte, disminuye la incidencia de reacciones secundarias indeseadas que provocan efectos secundarios tóxicos. Una vez en el interior de la célula, el platino(IV) es bio-convertido a la correspondiente especie de platino(II) expulsando los ligandos axiales (Figura 16). Aunque este primer agente quimioterapéutico de platino(IV) no recibió aprobación, abrió una nueva línea en el el diseño de fármacos que tenía en cuenta los estados de oxidación para su desarrollo<sup>22</sup>.

<sup>21</sup> H. Choy, C. Park, M. Yao. *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14, 1633.

<sup>22</sup> E. Ratzon, Y. Najajreh, R. Salem, H. Khamaisie, M. Ruthardt, J. Mahajna. *BMC Cancer.* **2016**, 16, 140.





## 1.4. Metalofármacos de rutenio en quimioterapia.

El descubrimiento y éxito clínico del *cis*-platino ha sido un gran impulso para el diseño de fármacos contra el cáncer que contienen nuevos ligandos y centros metálicos<sup>23,24</sup>. En la actualidad hay abiertos muchos campos de investigación enfocados hacia la obtención de metalofármacos que contengan en su estructura metales diferentes al platino, estudiando cuál es el mecanismo de acción de estos y los efectos secundarios que producen.

De los diferentes metales empleados uno de los más estudiados, y cuyos compuestos derivados se encuentran en fases más avanzadas de sus ensayos clínicos, es el rutenio, elemento objeto de estudio del presente trabajo de investigación.

Localizado en el grupo 8 de la Tabla Periódica, el rutenio fue descubierto en 1844 en Estonia por Karl Ernst Claus y fue nombrado tiempo después como “ruthenia”, cuyo significado literal es Rusia. El rutenio es el menos abundante de los metales de la mena del platino y, sin embargo, es el metal con la mayor gama de estados de oxidación<sup>25,26</sup>, aunque los estados de oxidación más habituales son el + II y el + III.

El primer interés significativo en el rutenio como agente anticancerígeno tuvo lugar en 1975 cuando Monti-Bragadin *et al.*<sup>27</sup> expusieron el efecto que varios complejos de metales de transición ejercían en el crecimiento filamentoso de la *Escherichia coli*, encontrando para el caso del  $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2]$  (compuesto de rutenio<sup>II</sup>) resultados muy similares al efecto ejercido por el *cis*-platino. Posteriormente During *et al.*<sup>28</sup>

---

<sup>23</sup> S. Gomez Ruiz. *An. Quím.* **2010**, 106, 13.

<sup>24</sup> J. Zhang, F. Zhang, H. Li, C. Liu, J. Xia, L. Ma, W. Chu, Z. Zhang, C. Chen, S. Li, S. Wang. *Curr Med Chem.* **2012**, 19, 2957.

<sup>25</sup> T. Naota, H. Takaya, S. Murahashi. *Chem Rev.* **1998**, 98, 2599.

<sup>26</sup> B.M. Trost, F.D. Toste, A.B. Pinkerton. *Chem Rev.* **2001**, 101, 2067.

<sup>27</sup> C. Monti-Bragadin, L. Ramani, L. Samer, G. Mestroni, G. Zassinovich. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1975**, 7, 825.

<sup>28</sup> J.R. Durig, J. Danneman, W.D. Behnke, E.E. Mercer. *Chem. Biol. Interactions.* **1976**, 13, 287.

comprobaron que el *fac*-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] (compuesto de rutenio<sup>III</sup>) detenía la división celular bacteriana en *Escherichia coli* induciendo un crecimiento filamentoso a concentraciones comparables a las requeridas por el *cis*-platino.

Estos complejos de rutenio mostraban una potencial actividad anticancerígena, pero su baja solubilidad era un factor negativo a la hora de su uso desde un punto de vista farmacológico, de modo que se abrió un nuevo campo de estudio en la búsqueda de derivados de Ru(II) o Ru(III) como potenciales fármacos antineoplásicos.

Dos derivados de rutenio, el [HIm][*trans*-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Im)] (NAMI-A) y el [HInd][*trans*-RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>](KP1019) se encuentran actualmente en fase de ensayo clínico.

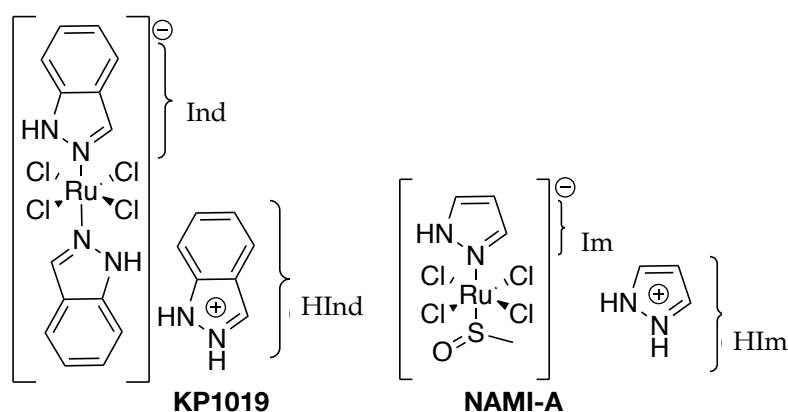


Figura 17. Compuestos anticancerígenos de rutenio en ensayos clínicos.

Después de extensas pruebas preclínicas, en 1999 el compuesto NAMI-A entró en la fase I de ensayos clínicos en el Instituto Holandés del Cáncer de Ámsterdam, siendo el primer compuesto de rutenio en alcanzar esta etapa. Aunque no presenta citotoxicidad *in vitro*, sí presenta actividad antimetastásica *in vivo*<sup>29,30</sup>. Esta singular capacidad para inhibir el desarrollo de las metástasis al parecer está relacionada con la inhibición del proceso angiogénico, es decir, inhibe el crecimiento de nuevos vasos

<sup>29</sup> G. Sava, S. Zorzat, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. DiGiovine, G. Pezzoni, L. Sartor, S. Garbisa. *Clin Cancer Res.* **2003**, 9, 1898.

<sup>30</sup> A. Bergamo, S. Zorzat, B. Gava, A. Sorc, E. Alessio, E. Lengo, G. Sava. *Anticancer Drugs.* **2000**, 11, 665.

sanguíneos<sup>31</sup>. Este complejo ha resultado ser prometedor, por lo que actualmente se encuentra en la fase III de ensayos clínicos<sup>32</sup>.

El KP1019, a diferencia del NAMI-A, muestra una notable actividad antiproliferativa *in vitro* en líneas celulares de cáncer humano<sup>33</sup>, como por ejemplo en las células de cáncer colorrectal<sup>34,35</sup>.

Comparando estas dos especies de rutenio con la mayor parte de los complejos de platino empleados como metalofármacos, podemos observar que muestran algunas diferencias<sup>36</sup> como es la geometría de coordinación octaédrica en lugar de la geometría planocuadrada que presentan los metalofármacos de platino (hay que tener en cuenta que la tendencia del Ru(II) y Ru(III) es la formación de compuestos con geometrías octaédricas, y en general las especies derivadas suelen ser estables tanto en estado sólido como en disolución). Por otra parte, los complejos de rutenio pueden llevar a cabo fácilmente reacciones de transferencia de electrones pasando del estado de oxidación +3 al +2, (o viceversa) sin modificar sustancialmente su estructura mientras que en el caso del platino los cambios entre los estados de oxidación (IV) y (II) requiere, tanto un cambio en el número de coordinación, como en la distancia de enlace interatómica.

Otra característica que permite establecer al rutenio no solo como una alternativa al platino sino como una entidad propia en el diseño de fármacos contra el cáncer es la

---

<sup>31</sup> A. Vacca, M. Bruno, A. Boccarelli, M. Coluccia, D. Ribatti, A. Bergamo, S. Garbisa, L. Sartor, G. Sava. *Br J Cancer*. **2002**, 86, 993.

<sup>32</sup> S. Leijen, S. A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, E. van Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens. *Invest New Drugs*. **2015**, 33, 201.

<sup>33</sup> C.G. Hartinger, M.A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P.J. Dyson, B.K. Keppler. *Chem. Biodiversity*. **2008**, 5, 2140.

<sup>34</sup> S. Kapitza, M. Pongratz, M.A. Jakupec, P. Heffeter, W. Berger, L. Lackinger, B.K. Keppler, B. Marian. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2005**, 131, 101.

<sup>35</sup> S. Kapitza, M.A. Jakupec, M. Uhl. *Cancer Lett*. **2005**, 226, 115.

<sup>36</sup> R. R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry: A new introduction to molecular structure and function*, **2008**, Elsevier, Amsterdam (Netherlands).

capacidad del rutenio de presentar tres estados de oxidación (II, III y IV) estables y accesibles en condiciones fisiológicas<sup>37</sup>. Las especies de rutenio(III) son relativamente más inertes que las especies de rutenio(II)<sup>38</sup> de modo que los complejos en estado de oxidación +3 son esencialmente profármacos, pudiendo activarse por reducción *in vivo* a complejos en estado de oxidación +2 una vez se encuentran dentro del organismo. Dicha reducción se ve favorecida por el hecho de que el metabolismo en células cancerígenas promueve una menor concentración de oxígeno en los tejidos, lo que conduce a un ambiente reductor<sup>39</sup>. Otro aspecto a destacar de los derivados de rutenio es que tienen una cinética de intercambio de ligandos lenta, similar a la de los complejos de platino<sup>40,41</sup>. Este aspecto resulta ser de gran importancia, ya que les confiere a estas especies una alta estabilidad cinética a nivel fisiológico, evitando que se lleven a cabo otras reacciones secundarias no deseadas que den lugar a la desactivación del complejo antes de que éste alcance su diana.

Por otro lado el rutenio tiene la capacidad para imitar al hierro en su unión a ciertas moléculas biológicas, como son la albúmina del suero (HSA) y la transferrina<sup>42</sup>. Cabe destacar que las células cancerosas, dado su rápido crecimiento, tienen un mayor requerimiento de hierro, por lo que se produce una sobreexpresión de receptores de transferrina en la superficie celular, lo que permite que los compuestos de rutenio puedan acumularse dentro de éstas. Sin embargo, la HSA es el principal vehículo de transporte de los compuestos de rutenio no solo por la elevada concentración de esta proteína en la sangre sino también por que forma aductos estables de forma rápida<sup>40</sup>.

---

<sup>37</sup> C.S. Allardyce, P.J. Dyson. *Platinum Met. Rev.* **2001**, 45, 62.

<sup>38</sup> M.J. Clarke. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 69.

<sup>39</sup> P. Schluga, C.G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M.A. Jakupiec, B.K. Keppler. *Dalton Trans.* **2006**, 14, 1796.

<sup>40</sup> J. Reedijk. *Platinum Met. Rev.* **2008**, 52, 1, 2.

<sup>41</sup> S. Page. *Ed. Chem.* **2012**, 26.

<sup>42</sup> J.C. Pessoa, I. Tomaz. *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, 3701.

Por tanto, es posible que la transferrina y la HSA estén involucradas en la selectividad que presentan los compuestos de rutenio por las células tumorigénicas.

Es importante tener en cuenta que los efectos antitumorales de los metalofármacos de rutenio se producen como resultado de procesos muy complejos. Estos procesos engloban, entre otros factores, modificaciones del ADN, como por ejemplo modificaciones en el reconocimiento del daño del ADN por proteínas y enzimas específicas, reparación del daño del ADN, varios procesos de señalización, apoptosis, necrosis. Todos estos procesos han de ser investigados en detalle para comprender el mecanismo de la actividad antitumoral de los fármacos de rutenio. Además, cabe destacar que la actividad antitumoral de estos compuestos puede implicar factores que no operan directamente a nivel de los aductos que forman las especies de rutenio con la diana biológica, si no también con factores como los que afectan a la cantidad activa del complejo de rutenio en cuestión.

En la bibliografía sobre este tema se pueden encontrar compuestos de rutenio de muy distinta naturaleza, como por ejemplo compuestos de coordinación con ligandos dimetilsulfóxido, ligandos polipiridínicos, ligandos heterocíclicos monodentados y, además, compuestos organometálicos.

Por ejemplo los compuestos *cis*- y *trans*- [Ru(DMSO)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] (figura 18) presentan interacción con el ADN aunque de distinta manera en función del isómero que interactúe<sup>43,44</sup>.

---

<sup>43</sup> V. Brabec, O. Novakova. *Drug. Resist. Update*. **2006**, 9, 111.

<sup>44</sup> M Gielen, E. R. T. Tiekink. *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*, **2005**, John Wiley & Sons, Ltd. Chichester (England).

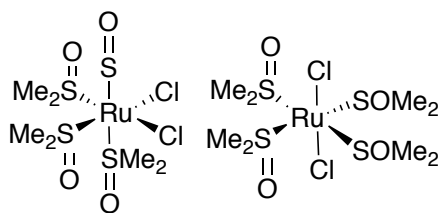


Figura 18. Compuestos anticancerígenos de rutenio *cis*- y *trans*-  $[Ru(DMSO)_4Cl_2]$  (derecha e izquierda respectivamente).

También los complejos heterocíclicos de rutenio(III) constituyen un grupo de compuestos entre los que destacan los compuestos NAMI-A y KP1019<sup>45</sup> (figura 17). Estos complejos pierden sus ligandos cloro y se transforman en sus correspondientes especies activas mediante procesos de hidrólisis que, se unen irreversiblemente al ADN. Sin embargo, el modo de unión al ADN es diferente al modo de unión que presenta el *cis*-platino. Los aductos que los dos compuestos forman con el ADN se llevan a cabo mediante enlaces covalente preferencialmente con las guaninas y las adeninas, aunque si bien es importante remarcar que en los últimos años se ha observado que el ADN no es la diana primaria de estos compuestos<sup>46</sup>.

En cuanto a los compuestos de rutenio con ligandos polipiridínicos<sup>43</sup> cabe destacar que algunos ya fueron empleados como sondas del ADN por lo que su interacción con él ya ha sido probada.

Un ejemplo es el *mer*- $[RuCl_3(terpy)]$  (figura 19) capaz de hidrolizarse para dar lugar a la especie activa que posteriormente se une covalentemente al ADN preferentemente a través de los residuos de guanina.

<sup>45</sup> G. Jaouen, N. Metzler-Nolte. Topics in organometallic chemistry: Medicinal Organometallic Chemistry, **2010**, Springer, Berlin (Germany).

<sup>46</sup> G. Palermo, A. Magistrato, T. Riedel, T. von Erlach, C.A. Davey, P.J. Dyson, U. Rothlisberger. *Chem.Med.Chem.* **2016**, 11, 1199.

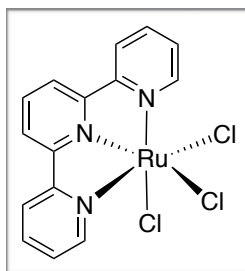


Figura 19. Compuesto *mer*-[RuCl<sub>3</sub>(terpy)].

Otro ejemplo lo constituyen los compuestos de rutenio con tres ligandos bidentados como es el caso de [Ru(II)(phen)<sub>2</sub>(PMIP)]<sup>2+</sup> (phen=1,10-fenantrolina, PMIP = 2-(4-metilfenil)imidazol-1,10-fenantrolina) (figura 20). Los modos de unión de estos compuestos con el ADN por lo general implican intercalación, aunque también es posible la interacción a través de los fosfatos de la cadena del ADN. La intercalación de los compuestos de este tipo distorsionan la estructura del ADN impidiendo los procesos de replicación que conducen finalmente a la muerte de la celular.

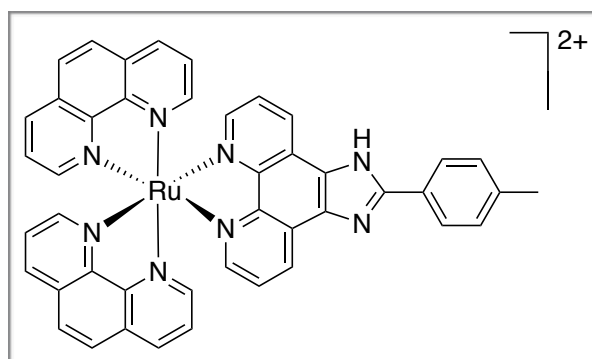


Figura 20. Estructura del compuesto [Ru(phen)<sub>2</sub>(PMIP)]<sup>2+</sup>.

En los últimos años ha surgido interés por la síntesis de compuestos de Ru(II) que presentan en su estructura ligandos derivados de bipyridina como agentes anticancerígenos.

La química de coordinación del ligando 2,2'-bipiridina (bipy) (figura 21) ha sido ampliamente estudiada y se conocen derivados del mismo unido a diversos iones metálicos<sup>47,48,49,50</sup>. (figura 22)

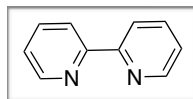


Figura 21. 2,2'-bipiridina.

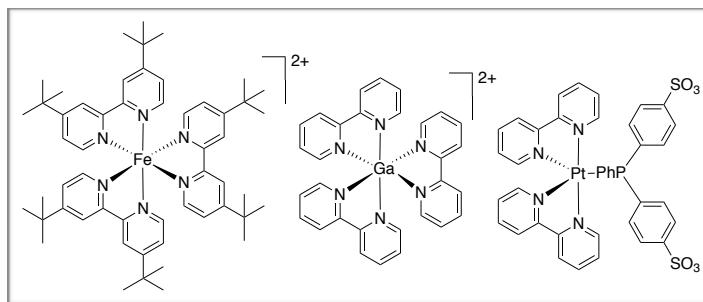


Figura 22. Ejemplo de compuestos metálicos con el ligando 2,2'-bipiridina.

Fue descrito por primera vez por Fritz Blau en 1888 y desde entonces el interés por los complejos metálicos que contienen en su estructura ligandos de este tipo se ha visto incrementado debido a las propiedades electroquímicas y fotofísicas que exhiben. Dicho ligando ofrece la posibilidad de formar complejos<sup>51</sup> en un amplio intervalo de estados de oxidación<sup>52</sup> muy estables debido al efecto quelato y además, la presencia de anillos aromáticos posibilita la interacción con biomoléculas como el ADN debido, entre otros factores, a la formación de interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$ <sup>53,54</sup>.

<sup>47</sup> J. A. McCleverty, T. J. Meyer, *Comprehensive Coordination Chemistry* (II). Elsevier. **2003**.

<sup>48</sup> M. Irwin, L. R. Doyle, T. Kramer, R. Herchel, J. E. McGrady, J.M. Goicoechea. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 12301.

<sup>49</sup> J. England, C. Scarborough, T. Weyhermüller, S. Sproules, K. Wieghardt. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 4605.

<sup>50</sup> W.K. Lo, G. Cavigliasso, R. Stranger, J.D. Crowley, A.G. Blackman. *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 3595.

<sup>51</sup> M. R. Lichtenthaler, F. Stahl, D. Kratzert, L. Heidinger, E. Schleicher, J. Hamann, D. Himmel, S. Weber, I. Krossing. *Nature Comm.* **2015**, 6, 8288.

<sup>52</sup> A. G. Sykes. *Advances in Inorganic Chemistry*, **1989**, Vol. 34, Academic Press.

<sup>53</sup> M. R. Gill, S. Norain Harun, S. Halder, R. A. Boghazian, K. Ramadan, H. Ahmad, K. A. Vallis. *Scientific Reports*. **2016**, 6, 31973.

<sup>45</sup> E. Gicquel, J.P. Souchard, F. Magnusson, J. Chemaly, P. Calsou, P. Vicendo. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, 12, 1517.



Por otro lado, los compuestos de rutenio con ligandos que contienen nitrógeno como átomos donadores poseen una cinética de disociación más lenta en comparación con aquellos que contienen ligandos halógeno, hecho que se ve incrementado cuando dichos ligandos pueden actuar como polidentados y formar con facilidad anillos quelato en el entorno del metal, confiriendo una gran estabilidad a los compuestos obtenidos. De este modo, es posible preparar complejos muy estables que puedan reaccionar de forma más controlada con dianas biológicas específicas en función de factores como la naturaleza de los ligandos bidentados, la carga del complejo y el carácter lipofílico de éste.

Además, estos compuestos de rutenio presentan unas propiedades fotoluminiscentes características que facilitan estudios posteriores como, por ejemplo, estudios de internalización celular. Por otro lado, la capacidad de actuar como agentes intercalantes del ADN<sup>55,56,57,58,59,60,61</sup> ha suscitado en los últimos años un gran interés por evaluar su actividad biológica como posibles agentes antineoplásicos.

Muestra del interés actual en el desarrollo de complejos con este tipo de ligandos lo evidencian la familia de compuestos de Ru con DQTT (DQTT: 12-(1,4-dihidroquinoxalin-6-il)-4,5,9,14 tetraazabenzó [b] trifenileno)<sup>62</sup> que se indican a continuación.

---

<sup>55</sup> U. Schatzschneider, J. Niesel, I. Ott, R. Gust, H. Alborzinia, S. Wölfl. *Chem Med Chem.* **2008**, 3, 1104.

<sup>56</sup> V. Pierroz, T. Joshi, A. Leonidova, C. Mari, J. Schur, I. Ott, L. Spiccia, S. Ferrari, G. Gasser. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 20376.

<sup>57</sup> T. Joshi, V. Pierroz, S. Ferrari, G. Gasser. *Chem. Med. Chem.* **2014**, 9, 1419.

<sup>58</sup> T. Joshi, V. Pierroz, C. Mari, L. Gemperle, S. Ferrari, G. Gasser. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53, 2960.

<sup>59</sup> V. Marin, E. Holder, R. Hoogenboom, U.S. Schubert. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 618.

<sup>60</sup> T. Chen, Y. Liu, W.J. Zheng, J. Liu, Y.S. Wong. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 6366.

<sup>61</sup> Z. Luo, L. Yu, F. Yang, Z. Zhao, B. Yu, H. Lai, K.H. Wong, S.M. Ngai, W. Zheng, T. Chen. *Metallomics.* **2014**, 6, 1480.

<sup>62</sup> C. Zhang, B.J. Han, C.C. Zeng, S.H. Lai, W. Li, B. Tang, D. Wan, G.B. Jiang, Y.J. Liu. *J Inorg Biochem.* **2016**, 157, 62.

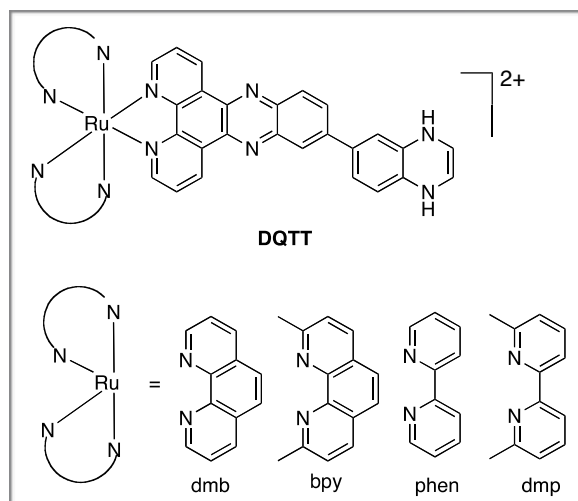


Figura 23. Compuestos de Ru con el ligando DQTT.

Hasta ahora, se han presentado compuestos mononucleares de rutenio que presentan una gran potencialidad como agentes anticancerígenos. Sin embargo, aunque en la bibliografía se encuentra una gran variedad de especies de rutenio polinucleares, su aplicación a la química medicinal sólo se ha explorado recientemente<sup>41</sup>.

Por ejemplo, se ha constatado que derivados dinucleares derivados de Ru(bipy)<sub>2</sub> en los que los dos centros metálicos se encuentran unidos por un conector de naturaleza flexible, semirrígida o rígida, presentan también actividad biológica, como es el caso de los compuestos de la figura siguiente, que han demostrado sus aptitudes como potenciales agentes anticancerígenos<sup>63,64,65,66</sup>.

<sup>63</sup> F. Westerlund, P. Nordell, J. Blechinger, T.M. Santos, B. Nordén, P. Lincoln. *J. Phys. Chem.* **2008**, 21, 6688.

<sup>64</sup> L. M. Wilhelmsson, F. Westerlund, P. Lincoln, B. Nordén. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12092

<sup>65</sup> M. Auzias, B. Therrien, G.S. Fink, P Stepnicka, W.H. Ang, P.J. Dyson. *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 578.

<sup>66</sup> A. Yadav, T. Janaratne, A. Krishnan, S.S. Singhal, S. Yadav, A.S. Dayoub, D.L. Hawkins, S. Awasthi, F.M. MacDonnell. *Mol Cancer Ther.* **2013**, 12, 643.

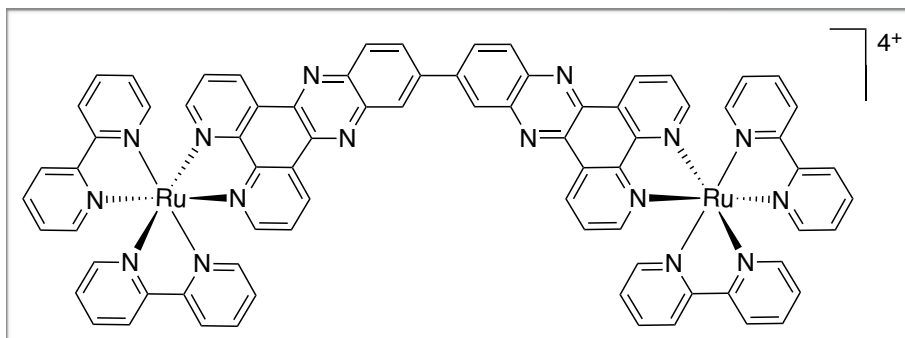


Figura 24. Estructura de  $[Ru(bipy)_2(N-dppz)]^{4+}$ .

Además de los compuestos de rutenio con ligandos polipiridilos, en la actualidad los compuestos organometálicos de rutenio con ligandos areno (figura 26) han destacado también en el desarrollo de compuestos anticancerígenos. Este tipo de compuestos se caracterizan por tener una estructura de semisandwich cuya geometría alrededor del centro del metal es por lo general pseudotetraédrica.

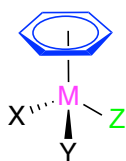


Figura 25. Estructura de “taburete de piano” característica de los compuestos Ru-areno.

La potencialidad de los compuestos de Ru(II) areno como fármacos antitumorales<sup>67,68,69</sup> y en particular los compuestos  $[Ru(\eta^6\text{-areno})(X,Y)(Z)]$  (donde XY = ligando quelante y Z = ligando monodentado), se debe a que el ligando areno confiere estabilidad al sistema debido a la tipología de unión al centro metálico y, además, es relativamente inerte a la sustitución. Por otro lado el ligando quelatante proporciona no solo estabilidad adicional a toda la estructura sino también la capacidad de modular las propiedades electroquímicas del centro metálico.

<sup>67</sup> A.F.A. Peacock, P.J. Sadler. *Chem. Asian. J.* **2008**, 3, 1890.

<sup>68</sup> R.E. Morris, R.E. Aird, P.S. Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N.D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D.I. Jodrell, P.J. Sadler. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3616.

<sup>69</sup> A.M. Pizarro, A. Habtemariam, P. J. Sadler. *Top. Organomet. Chem.* **2010**, 32, 21.

Finalmente el ligando monodentado, como por ejemplo un haluro, permite la activación de la molécula al proporcionar un sitio de coordinación para la unión a biomoléculas.

La familia de compuestos rutenio-areno-1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano (Ru-RAPTA), son un ejemplo de compuestos organometálicos de Ru(II) con ligandos areno que han sido extensamente estudiados como agentes anticancerígenos. Se caracterizan por la incorporación del ligando PTA (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano) donde el átomo de fósforo actúa como átomo donador. El compuesto de la figura inferior (RAPTA-C), por ejemplo, exhibió una inhibición significativa de la progresión del cáncer *in vivo*, y lo hace con una toxicidad general notablemente baja

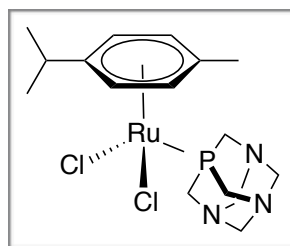


Figura 26.  $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(PTA)(Cl)_2]$ , (RAPTA-C)

También se conocen compuestos híbridos de Ru con areno/polipiridilos, que combinan las características de los dos tipos de ligandos y confieren al producto final unas propiedades biológicas interesantes<sup>70,71</sup>, como por ejemplo el compuesto  $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(p\text{-NMe}_2\text{PIP})(Cl)]$ <sup>72</sup> (figura 27) que posee una actividad antitumoral considerable que al parecer está relacionada con los daños que causa al intercalar en el ADN. Los ensayos de citotoxicidad permitieron observar no solo una selectividad para la línea celular de osteosarcoma MG-63, sino también una baja toxicidad para las células normales HK-2 del epitelio tubular proximal (riñón).

<sup>70</sup> A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernández, S. Parsons, I. D. H. Oswald, A. Parkin, F. P. A. Fabbiani, J. E. Davidson, A. Dawson, R. E. Aird, D. I. Jodrell and P. J. Sadler. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6858.

<sup>71</sup> T. Bugarcic, A. Habtemariam, J. Stepankova, P. Heringova, J. Kasparkova, R. J. Deeth, R. D. L. Johnstone, A. Prescimone, A. Parkin, S. Persons, V. Brabec and P. J. Sadler. *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 11470.

<sup>72</sup> Q. Wu, C. Fan, T. Chen, C. Liu, W. Mei, S. Chen, B. Wang, Y. Chen, W. Zheng. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 63, 57.

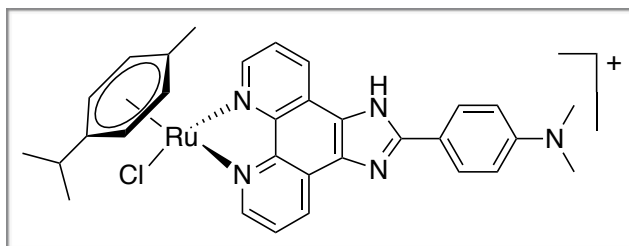


Figura 27. [Ru(η<sup>6</sup>-p-cimeno)(p-NMe<sub>2</sub>PIP))(Cl)]



---

## 2. Antecedentes y objetivos.



En la introducción se expuso el hecho de que, dentro de los diversos fármacos empleados en el tratamiento contra el cáncer, el rutenio se postulaba como un centro metálico alternativo, que permitía minimizar considerablemente los efectos secundarios que presentan los compuestos de platino, sin abandonar la potente actividad antiproliferativa que muestran algunos derivados, como por ejemplo el KP1019, o la sobresaliente capacidad antimetastática del compuesto NAMI-A.

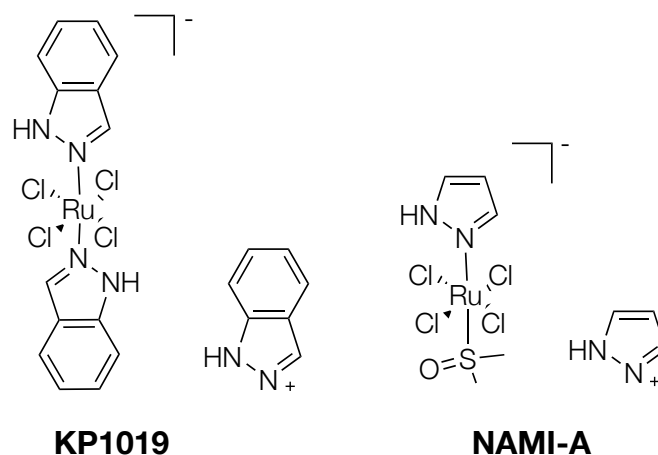


Figura 28. Compuestos anticancerígenos de rutenio. KP1019 y NAMI-A.

En este sentido, los compuestos de rutenio que contienen en su estructura ligandos polipirridilo (**Tipo I**) y areno (**Tipo II**), presentan unas propiedades físicas y químicas que los han hecho eficaces para su uso como posibles fármacos anticancerígenos.

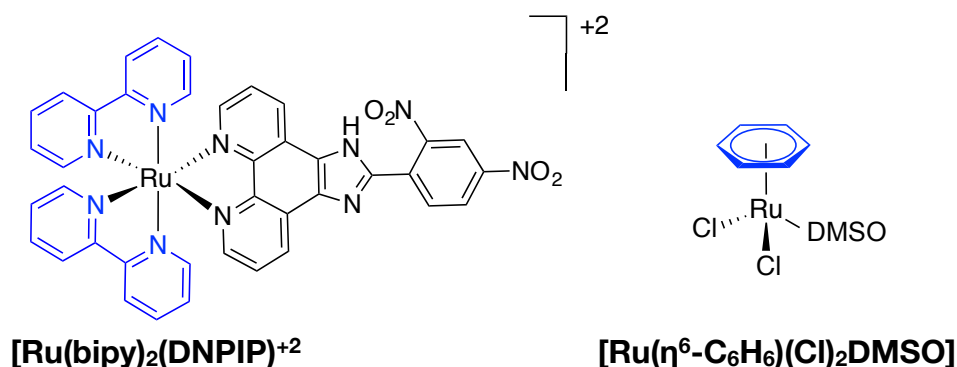


Figura 29. Compuestos anticancerígenos de rutenio **tipo I** (izquierda) y **tipo II** (derecha).



El grupo de investigación de Química de Coordinación y Organometálica integrado dentro del grupo “Química Molecular y de Materiales” (QUIMOLMAT, referencia G000709 en el catálogo de investigación de la Universidad de A Coruña), cuenta con una elevada experiencia en el campo del diseño, síntesis y caracterización estructural de compuestos de coordinación y organometálicos.

A lo largo de los últimos años la investigación de los integrantes de dicho grupo se ha centrado en preparar y caracterizar una gran variedad de complejos metálicos derivados de metales de transición, principalmente metales nobles como son Pd(II), Pt(II) y Ru(II), así como el estudio de la reactividad de dichos complejos frente a ligandos mono- y polidentados de diferente naturaleza, como son aminas, diaminas, mono-, di- y trifosfinas terciarias, carbenos, diarsinas y ligandos heterobifuncionales.<sup>73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83.</sup>

---

<sup>73</sup> D. Vázquez-García, A. Fernández, M. López-Torres, A. Rodríguez, N. Gómez-Blanco, C. Viader, J. M. Vila, J.J. Fernández. *Organometallics*, **2010**, 29, 3303.

<sup>74</sup> D. Vázquez-García, A. Fernández, M. López-Torres, A. Rodríguez, A. Varela, M.T. Pereira, J. M. Vila, J. J. Fernández. *Organometallics*, **2011**, 30, 396.

<sup>75</sup> J.J. Fernández, A. Fernández, M. López-Torres, D. Vázquez-García, A. Rodríguez, J.M. Vila, J.J. Fernández. *Organometallics*. **2011**, 30, 396.

<sup>76</sup> N. Gómez-Blanco, J. J. Fernández, A. Fernández, D. Vázquez-García, M. López-Torres, J.M. Vila. *Eur J Inorg Chem*. **2009**, 3071

<sup>77</sup> J. J. Fernández, N. Gómez-Blanco, A. Fernández, D. Vázquez-García, M. López-Torres, J.M. Vila. *Polyhedron*. **2009**, 28, 2679

<sup>78</sup> D. Lata, M. T. Pereira, J. M. Ortiueira, J. Martínez, B. Bermúdez, J.J. Fernández, A. Fernández, J.M. Vila. *Polyhedron*. **2012**, 41, 30.

<sup>79</sup> A. Fernández, M. López-Torres, S. Castro-Juiz, M. Merino, D. Vázquez-García, J.M. Vila, J.J. Fernández. *Organometallics*. **2011**, 30, 386.

L. Naya, D. Vázquez-García, A. Fernández, M. López-Torres, V. Ojea, I. Marcos, J.M. Vila, J.J. Fernández. *Eur J Inorg Chem*. **2016**, 422.

<sup>81</sup> L. Naya, D. Vázquez-García, A. Fernández, M. López-Torres, I. Marcos, O.A. Lenis, M.T. Pereira, J.M. Vila, J.J. Fernández. *J. Organomet. Chem*. **2014**, 192.

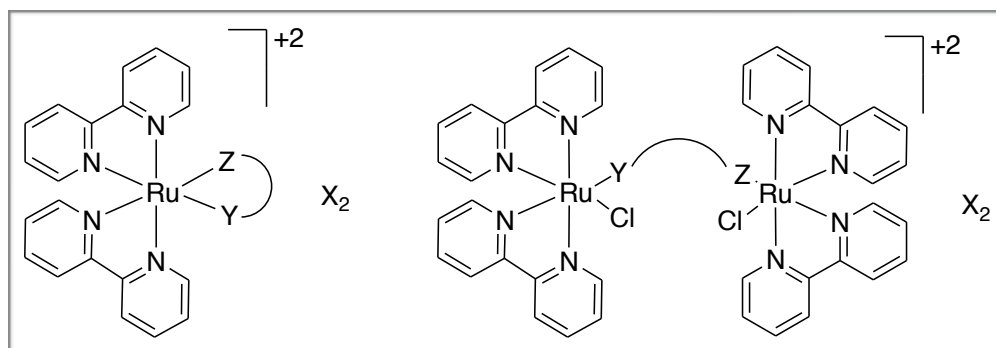
<sup>82</sup> J.A. Cabeza, I. del Río, J.M. Fernandez-Colinas, E. Perez-Carreño, D. Vazquez-García. *Organometallics*. **2010**, 29, 4818.

<sup>83</sup> J.A. Cabeza, I. del Río, J.M. Fernandez-Colinas, E. Perez-Carreño, D. Vazquez-García. *Organometallics*. **2010**, 29, 3828.

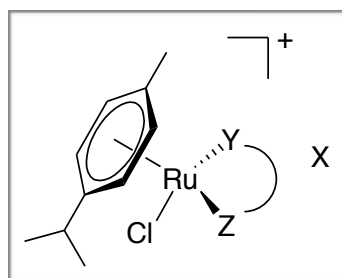
Recientemente el grupo se ha interesado por las aptitudes biológicas de los compuestos preparados, especialmente los complejos derivados de rutenio, y más concretamente en su capacidad para actuar como agentes antitumorales.

Inspirándonos en los complejos derivados de rutenio (II) (figura 29), en el presente trabajo de investigación nos planteamos la preparación de nuevos compuestos de rutenio con ligandos polipiridilo y areno. Además, teniendo en cuenta que uno de los inconvenientes que se observaron en algunos compuestos de **Tipo I** y **II**, ya desarrollados para su estudio como potenciales fármacos antineoplásicos, era su estabilidad, se intentará obtener compuestos más estables introduciendo en su estructura ligandos polidentados que puedan quelatar al centro metálico. En este sentido, se plantearon para el presente trabajo los siguientes objetivos:

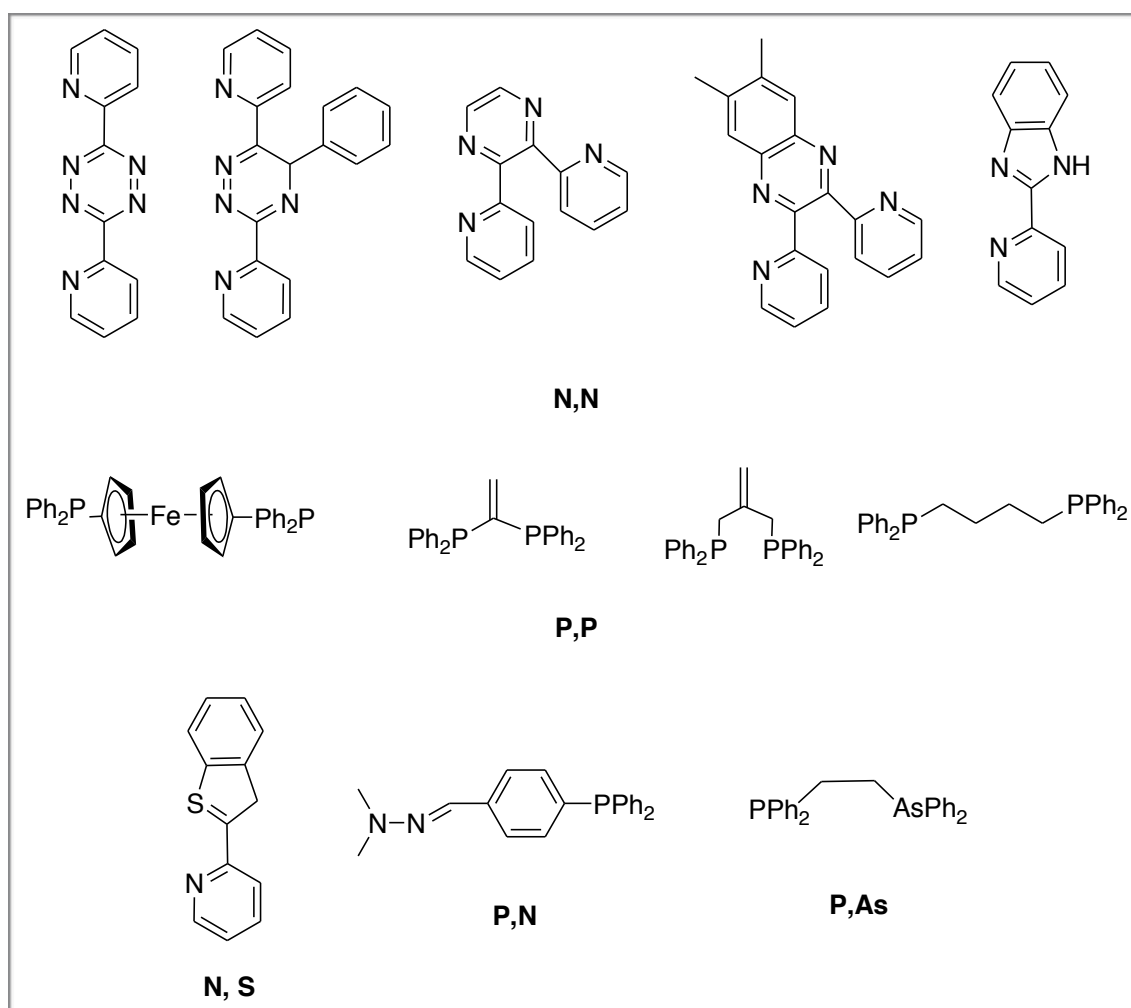
1. Síntesis y caracterización de compuestos de coordinación mononucleares y polinucleares de rutenio (II) derivados de bipyridina.



2. Síntesis y caracterización de compuestos mononucleares de rutenio(II) derivados de *p*-cimeno.



Para la preparación de la primera familia de compuestos que contienen ligandos bipyridina se utilizará como precursor de partida el complejo *cis*-diclorobis(2,2'-bipyridina)rutenio(II), y para la obtención de los derivados de la segunda familia de compuestos conteniendo ligando *p*-cimeno, se empleará como precursor el tetraclorobis(*p*-cimeno)dirutenio(II). Con el objetivo de incrementar la estabilidad de los compuestos preparados, para su posterior estudio como potenciales fármacos antineoplásicos, se introducirán en su estructura ligandos bidentados que puedan quelatar al centro metálicos, tanto homobidentados N,N y P,P, como heterobidentados N,S, P,N y P,As.

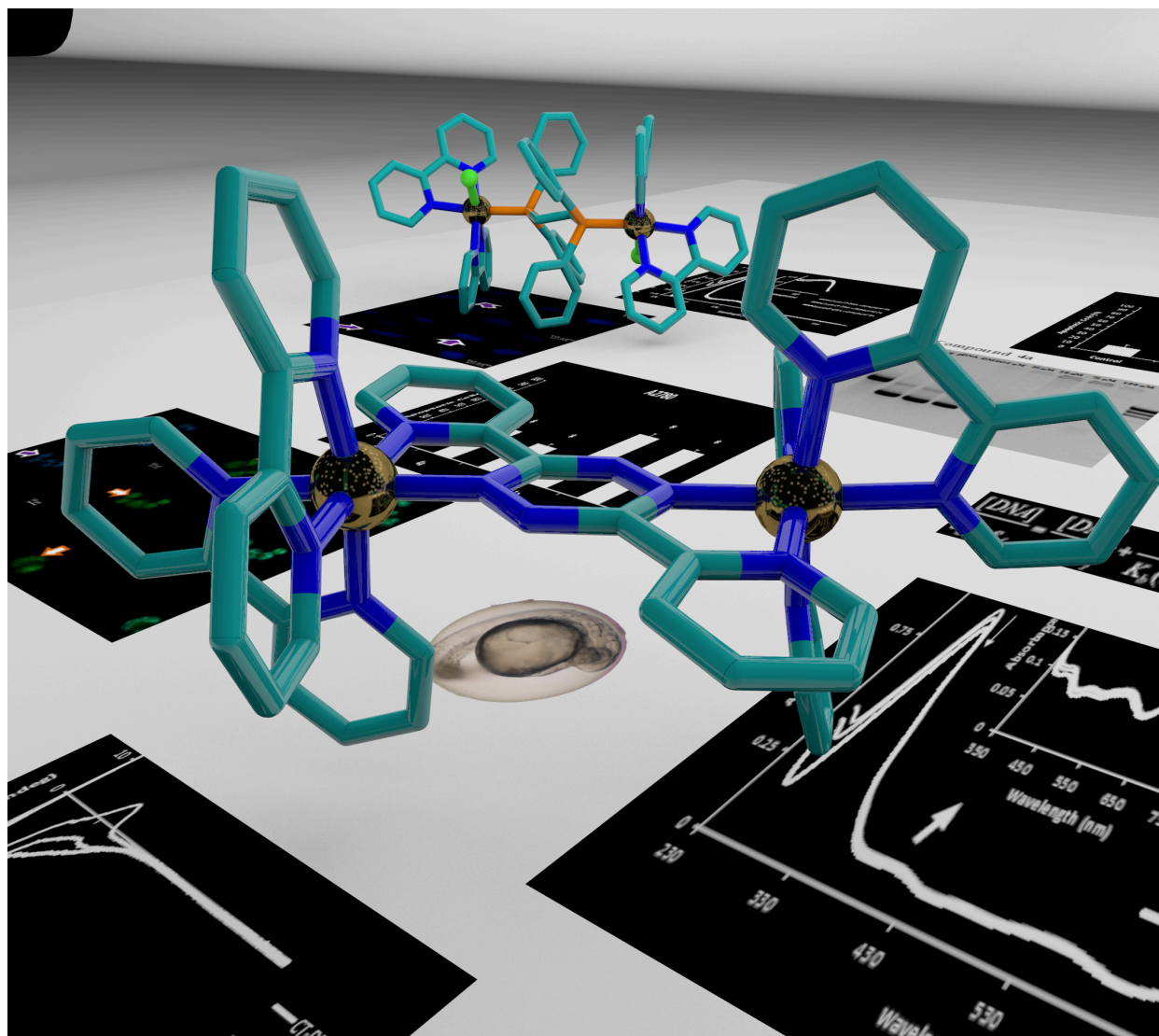


3. Estudios *in vitro* de la actividad citotóxica de todos los compuestos obtenidos en distintas líneas celulares de cáncer humano: A2780; MCF7; A529; K562; HCT116; HT29; PC3; V79 y Fibroblastos.
4. En base a la actividad citotóxica que presenten los compuestos, se hará una selección de éstos en función de la actividad y solubilidad en medios acuoso para llevar a cabo los siguientes estudios:
  - 4.1. Estudios de interacción con el ADN, mediante la espectroscopia de ultravioleta visible y dicroísmo circular.
  - 4.2. Estudios de interacción con albúmina humana por espectroscopia de fluorescencia.
  - 4.3. Con el propósito de completar el estudio de la interacción de los compuestos seleccionados con el ADN y albúmina humana, e indagar sobre la posible forma de actuación de los compuestos con estas biomoléculas, se llevará a cabo un estudio computacional mediante cálculos teóricos.
  - 4.4. Estudios *in vivo* de la actividad tóxica en el modelo pez cebra.

Por otra parte, con el fin de optar a la mención de Doctorado Internacional, se ha realizado una estancia de tres meses en la Faculdade de Ciencias de la Universidad de Lisboa, en el grupo BioIN del Centro de Química Estructural, bajo la supervisión de la Dra. Ana Isabel Tomaz, cuya investigación se basa en el estudio de la aplicación de complejos metálicos al tratamiento del cáncer. El objetivo del trabajo realizado fue la síntesis de una familia de compuestos de rutenio(II) de **Tipo I**, caracterización de los mismos y estudios de las propiedades electroquímicas. Además, de los compuestos con mayor actividad y solubilidad, se estudió la interacción con albúmina humana por espectroscopia de fluorescencia.

---

# 3. Parte experimental.



## 3.1. Disolventes y reactivos.

### 3.1.1. Disolventes.

Se han empleado los disolventes que se indican a continuación, alguno de ellos purificados en su caso mediante reflujo bajo atmósfera de argón en presencia de un agente desecante adecuado.

- Acetona (Panreac, 99.5%)
- Acetonitrilo (Panreac, 99.7%)
- Agua ultrapura (Milli-Q)
- Cloroformo (Panreac, 99.5%)
- Dimetilsulfóxido (Panreac, 99.5%)
- Dimetilformamida (Panreac, 99.8%)
- Éter dietílico (Panreac, 99.7%)
- Etanol absoluto<sup>a</sup> (Panreac, 99.5%)
- Hexano<sup>b</sup> (Panreac, 95%)
- Tolueno<sup>b</sup> (Panreac, 99.5%)

<sup>a</sup> Se empleó previo secado sobre KOH (10.0 g/L).

<sup>b</sup> Se empleó previa deshidratación por reflujo sobre hilo de sodio y destilación bajo atmósfera de argón.

Para la realización de los espectros de RMN de los compuestos se emplearon como disolventes deuterados :  $\text{CDCl}_3$  (SDS, 99.8%),  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  (Panreac, 99.5%),  $\text{DMSO-d}_6$  (SDS, 99.8%) y  $\text{Acetona-d}_6$  (SDS, 99.8%).

### 3.1.2. Reactivos.

Se utilizaron los reactivos indicados a continuación, tal y como han sido suministrados por los respectivos proveedores:

➤ Fosfinas:

- 1-difenilfosfino-2-difenil arsinoetano (Aldrich, 94%)
- *o*-(difenilfosfina)benzaldehído (Aldrich, 97%)
- 1,1-bis(difenilfosfino)eteno (Aldrich, 98%)
- 1,1-bis(difenilfosfinometilen)eteno (Aldrich, 98%)
- 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno (Aldrich, 97%)

➤ Aminas:

- 2-(2-piridil)benzimidazol (Aldrich, 97%)
- 2-(2-piridil)benzo[b]tiofeno (Aldrich, 97%)
- 2,2'-bipiridina (Aldrich, 99%)
- *N,N*-dimetilhidracina (Aldrich, 98%)
- 2,3-bis(2-piridil)pirazina (Aldrich, 98%)
- 3, 6-di-2-piridil-1, 2, 4, 5-tetrazina (Aldrich, 96%)
- 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina (Aldrich, 99%)
- 6,7-dimetil-2,3-di(piridin-2-il)quinoxalina (Aldrich, 98%)

➤ Compuestos metálicos:

- Bromuro potásico (Fluka, 99%)
- Cloruro de litio (Aldrich, 99%)
- Cloruro de rutenio(III) (Johnson Matthey 40-55% en Ru)
- Ferroceno (Aldrich, 98%)
- Hidróxido potásico (Alfa Aesar, 85%)
- Hexafluorofosfato de talio(I) (Alfa Aesar, 97%)
- Tetraclorobis(*p*-cimen)dirutenio(II) (Johnson Matthey, 40%Ru)
- Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio  $n\text{Bu}_4[(\text{TBA})\text{PF}_6]$  (Aldrich, 98%)
- Trifluorometanosulfonato de plata (Aldrich, 99%)

➤ Otros reactivos:

- Ácido acético (Fluka, 99.8%)
- Ácido *N*-2-hidroxietilpiperacina-*N'*-2'-etanesulfónico (HEPES) (Aldrich, 99.5%)
- ADN de ternero (*ct*-ADN) (Aldrich, fibras tipo I)
- Albúmina humana HSA (Alfa Aesar, 96%)
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Aldrich, 97.5%)
- Como relleno de las columnas cromatográficas se utilizó óxido de alúmina (Fluka), de tamaño de partícula (0.05-0.15 mm), pH (9.5-0.5).
- Para la realización de la cromatografía en placa fina se utilizó alúmina con indicador de fluorescencia F 254 (Fluka) y silica gel 60 F254 (Merck).

### 3.1.3. Gases comprimidos.

Argón (Carburos Metálicos): se utilizó como gas comprimido a presión en botella para la generación de atmósfera inerte.



## 3.2. Técnicas de Caracterización.

### 3.2.1. Análisis elemental.

Las determinaciones analíticas de los porcentajes de carbono, hidrógeno y nitrógeno se realizaron en un analizador elemental CARLO ERBA modelo 1108.

### 3.2.2. Espectroscopia de infrarrojo.

Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrómetro Satellite FTIR en la zona 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , preparándose las muestras como pastillas en KBr. Para la realización de los espectros ATR (Attenuated Total Reflection) se usó un espectrómetro de infrarrojo BRUKER VECTOR 22 con accesorio para ATR.

### 3.2.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  se registraron a temperatura ambiente en los espectrómetros BRUKER AV-300F (300.0 MHz para  $^1\text{H}$ , 121.5 MHz para  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ ), y BRUKER AC-500F (500.0 MHz para  $^1\text{H}$ , 202.5 MHz para  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ ).

### 3.2.4. Espectrometría de masas.

Los espectros FAB de baja resolución se registraron utilizando un espectrómetro de masas de sector magnético Thermo MAT95XP, mediante la técnica de bombardeo con átomos rápidos (FAB) con iones  $\text{Cs}^+$  utilizando alcohol nitrobenílico como matriz (3-NBA).

Los espectros de ESI de baja resolución se realizaron en el espectrómetro LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite.

### 3.2.5. Medidas de conductividad.

Las medidas de conductividad molar de los compuestos se realizaron a 25 °C en un conductivímetro CRISON modelo GLP 32, provisto de compensador automático de temperatura y calibrado con patrones Crison de conductividades 12.88 mS/cm (KCl 0.1 M) y 1413  $\mu$ S/cm (KCl  $10^{-2}$  M), empleando disoluciones  $10^{-3}$  M de los compuestos. Como disolvente se empleó etanol, acetona o acetonitrilo en función de la solubilidad de cada compuesto.

### 3.2.6. Voltametría cíclica.

La caracterización se llevó a cabo en un potenciostato/galvanostato EG&G Princeton Applied Research (PAR), empleando una célula electroquímica de tres electrodos. Como contraelectrodo se utilizó un electrodo de plata, ya incorporado en la célula electroquímica; como electrodo de trabajo se empleó un electrodo de disco de platino y finalmente como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de plata en contacto con la disolución. Las medidas se realizaron empleando una concentración de  $10^{-3}$  M de muestra y 0.1 M de electrolito soporte,  $n\text{Bu}_4[(\text{TBA})\text{PF}_6]$ , y como patrón de referencia interna se utilizaron los valores de potencial correspondientes a ferrocinio/ferroceno.

### 3.2.7. Difracción de RX.

Las medidas de la intensidad de los rayos difractados por cada cristal fueron tomadas en los difractómetros SIEMENS SMART CCD 1K y BRUKER X8 APEX mediante el método de barrido en omega-phi. La totalidad de las reflexiones medidas fueron corregidas de los efectos de Lorentz y polarización; se efectuó, además, una corrección de absorción empleando un método semiempírico basado en la medida repetida de reflexiones equivalentes por simetría mediante el uso del programa SADABS. Las estructuras se resolvieron por métodos directos y se refinaron por el

método de mínimos cuadrados de matriz completa de F<sup>2</sup>. Los átomos de hidrógeno se colocaron en posiciones calculadas y se refinaron vinculados al átomo a que estaban unidos. Se prosiguió el refinamiento hasta alcanzar la convergencia de todos los parámetros refinados, teniendo en cuenta el carácter anisotrópico de todos los átomos no hidrogenoides. La resolución y posterior refino de la estructura se llevó a cabo empleando el paquete de programas SHELX-97.

Se recogieron datos tridimensionales a temperatura ambiente de rayos X en un CCD Bruker Smart 1k y un difractómetro Bruker X8 Apex utilizando radiación Mo K $\alpha$  monocromada de grafito. Todas las reflexiones medidas fueron corregidas para Lorentz y los efectos de polarización y para la absorción por métodos semi-empíricos basados en simetría equivalente y reflexiones repetidas. Las estructuras fueron resueltas por métodos directos y refinadas por el método de mínimos cuadrados de matriz completa en F<sup>2</sup>. Los átomos de hidrógeno se incluyeron en posiciones calculadas y se refinaron en modo de conducción.

En el cristal de **1h** presentó un desorden que implicaba a los átomos de fósforo y arsénico que intercambian sus posiciones, por lo que el refinamiento se trató como un desorden con ocupaciones complementarias del 57 y 43% para cada componente. También se encontró que los iones triflato estaban desordenados en dos posiciones y se refinaron con ocupaciones complementarias del 57/43% y 70/30%.

Para el complejo **1j** no se pudo obtener un cristal con propiedades cristalográficas mejores, por ello el parámetro R<sub>int</sub> para el cristal del complejo **1j** fue mayor que el valor deseado, sin embargo los resultados finales fueron aceptables. Para el complejo **1i** se obtuvieron cristales a partir de una solución en etanol del complejo, cuya estructura molecular era similar a la descrita anteriormente para un cristal que contenía hexafluorofosfato como contraión en lugar de triflato<sup>84</sup>, sin embargo, la geometría de **1i** se discute en la sección resultados y discusión con fines comparativos.

---

<sup>84</sup> V. W. -W. Yam, V. W.-M. Lee, K.K. Cheung, *Dalton Trans.* **1997**, 2335.

Se encontró también que una serie de moléculas de disolvente desordenadas estaban presentes en el cristal de **1k**, por lo que se empleó la herramienta *PLATON SQUEEZE* como mejor aproximación para manejar la densidad electrónica de estas moléculas de disolvente desordenadas<sup>85</sup>. Después del uso de *PLATON SQUEEZE*, el índice *R* mejoró de 0.089 a 0.050.

En el cristal de **1l**, al igual que el compuesto **1h**, presentó un desorden que implicaba a los átomos de fósforo y arsénico que intercambian sus posiciones por lo que el refinamiento se trató como un desorden con ocupaciones complementarias del 50% para cada componente.

El parámetro  $R_{\text{int}}$  para el cristal del complejo **1n** era mayor que el valor deseable, sin embargo, no se pudo obtener un cristal mejor. Además, se encontró que el contraión triflato estaba desordenado en dos posiciones por lo que se refinaron con ocupaciones complementarias de 60/40%. En la unidad asimétrica también se encontró una molécula de disolvente que se modeló como una molécula de etanol y se refinó con una ocupación del 50%. Finalmente se encontró una densidad electrónica residual para la que fue necesario emplear *PLATON SQUEEZE* obteniendo un valor de *R* mejorado que pasó de 0,104 a 0,067

### 3.2.8. Espectroscopia de ultravioleta visible.

Los espectros de absorción se registraron en un JASCO V-560, y en un JASCO V-650 mediante el uso de cubetas de 1 cm de longitud. Esta técnica fue utilizada tanto para estudiar la estabilidad de los compuestos como para el estudio de la interacción de los complejos con el ADN. Para los estudios de interacción de los complejos con el ADN se mantuvo constante la concentración de compuesto y gradualmente se adicionaron cantidades crecientes de *ct*-ADN. Para una mayor precisión en la concentración de

---

<sup>85</sup> A. L. Spek. *J. Appl. Cryst.* **2003**, 36, 7.

ADN se midió su absorbancia en el tampón empleado, y dado que el valor de absorptividad molar a 260 nm de ADN es  $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , se puede calcular la concentración a partir de la ecuación:

$$Abs = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Además, para garantizar la pureza del ADN utilizado se midió la relación de absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280 ( $A_{260}/A_{280}$  nm). Si las relaciones son superiores a 1.8 es indicativo que el ADN empleado está razonablemente libre de contenido proteico. Para todos los ensayos realizados, la relación fue mayor que 1.8.

#### Preparación de tampón HEPES.

Para un volumen de  $250 \text{ cm}^3$  de  $\text{H}_2\text{O}$  millipore es necesario añadir 10 mmol (0.5958 g) de ácido *N*-2-hidroxietilpiperacina-*N'*-2'-etanosulfónico, cuya masa molecular es 238.3056 g/mol. Posteriormente se ajustó el pH a 7.4 con una disolución de KOH 4 M.

#### Preparación de ADN.

Se disuelven 0.2 g de ADN en  $30 \text{ cm}^3$  de tampón (HEPES) y se conserva una semana a  $4^\circ\text{C}$  para la correcta hidratación del ADN. Posteriormente se calcula la concentración exacta del DNA preparado mediante UV sabiendo que la absorptividad molar del ADN a 260 nm es de  $6600 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.9. Espectroscopia de fluorescencia.

#### Estudios de interacción entre la albúmina y los compuestos de rutenio.

Los experimentos fueron realizados en los fluorímetros Fluorolog-FL3-22; Horiba Jobin Yvon y Fluoromax Plus-P; Horiba. Para proceder a realizar los ensayos con la HSA se realizó un ensayo previo, en el cual se escogieron las ventanas de trabajo y el tiempo de integración, así como la concentración de HSA ideal para utilizar en las

titulaciones. Las muestras fueron preparadas separadamente e incubadas en la oscuridad durante 24 horas a 37 °C, empleándose como medio tamponado una solución de 10 mM Hepes pH 7.4.

Las titulaciones de los complejos con la HSA fueron realizadas utilizando la albúmina humana como sonda excitando selectivamente el residuo triptófano 214 a 295 nm, empleando una concentración constante de HSA igual a 2  $\mu$ M y una concentración variable de complejo.

#### Preparación de la Albúmina.

La albúmina no precisa de tiempos largos de hidratación como el ADN, sabiendo que su peso molar es 66500 g/mol se puede obtener una concentración determinada en el tampón elegido, en este caso HEPES. Para precisar el valor de concentración se recurre a la medida de UV-Visible sabiendo que la absortividad molar de la HSA a 280 nm es 36850 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.10. Medidas de pH.

El pH de las disoluciones acuosas se midió a temperatura ambiente con un electrodo combinado de pH de Aldrich Chemical Co. que se calibró antes de cada medida con patrones Crison a pH 4.0 y 7.0.

### 3.2.11. Espectroscopia de dicroísmo circular.

Las medidas de dicroísmo circular se llevaron a cabo en un espectropolarímetro CD-ORD Jasco J-815, con un flujo continuo de nitrógeno para purgar el polarímetro y empleando celdas de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico que se mantuvieron a temperatura constante (293 K) gracias a un sistema de refrigeración.

### 3.2.12. Cálculos computacionales.

Todos los cálculos se realizaron utilizando el programa Gaussian 09 gracias a los recursos computacionales del Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA). Las geometrías de partida se obtuvieron a través del programa GaussView empleando distancias y ángulos de enlace estándar.

La optimización de las geometrías se llevó a cabo empleando el modelo HF, TPSSh, definiendo mediante el conjunto base 6\_31G(d) los átomos de los ligandos. Se aplicó, además, para el átomo de rutenio, las funciones de valencia y del Potencial Efectivo del Core (ECP) LanL2DZ.

### 3.2.13. Docking molecular.

Los estudios fueron realizados con la versión gratuita del programa Molegro Virtual Docker. Para los receptores ADN y albúmina se usaron estructuras cristalinas de la base de datos *Protein Data Bank*. Los receptores fueron preparados previamente para el estudio eliminando las moléculas de agua presente en las estructuras cristalinas, y añadiendo todos los hidrógenos. Los compuestos también fueron preparados determinando las posibles torsiones y los átomos capaces de formar enlaces de hidrógeno. Además, se tuvo en cuenta la naturaleza metálica del átomo de rutenio. Para la visualización y representación de las moléculas se utilizó el programa Chimera y el programa molsoft Browser Pro.

### 3.2.14. Ensayos de citotoxicidad.

Para la evaluación citotóxica las células fueron sembradas en 200  $\mu$ L de medio completo en placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h antes de la prueba compleja para permitir la adhesión celular. La solución madre (20 mM) en DMSO del complejo fue preparada al momento y se utiliza para las diluciones secuenciales en medio completo. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo celular no excede el 0.5%.

El análisis de la supervivencia celular se realizó al cabo de 72 h. Se añadió una solución de MTT (0,5 mg/ml) [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] disuelto en PBS (tampón fosfato) a cada pocillo (200  $\mu$ L) y las placas se incubaron a 37 °C durante 3-4 h. Después de este tiempo el medio se descartó, se añadieron 200  $\mu$ L de DMSO y se añadió a cada pocillo para disolver los cristales de formazán. La absorbancia fue medida a 570 nm con un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek). Cada experimento se repitió al menos tres veces y cada concentración fue probada en al menos seis réplicas. Los resultados se expresan como un porcentaje de supervivencia con respecto al control de las células en ausencia del compuesto. Los valores de IC<sub>50</sub> (concentración de fármaco que induce un 50% de muerte celular) se calcularon a partir de curvas construidas mediante el trazado de la supervivencia celular (%) en comparación con la concentración de compuesto utilizando el programa GraphPad Prism.



### 3.2.15. Ensayos *in vivo* en el modelo pez cebra.

Los machos y las hembras se mantuvieron separados y se unieron la noche anterior a la puesta, que tuvo lugar al amanecer. Se recolectaron embriones fertilizados de la jaula de desove y se enjuagaron con agua de grifo estéril desclorada (SDTW). Se utilizaron 12 embriones por concentración de modo que se pusieron en las distintas concentraciones de cada compuesto tan pronto como fue posible. Las concentraciones empleadas en el ensayo fueron elegidas en función de los resultados de citotoxicidad *in vitro*.

Los análisis de toxicidad se realizaron en placas de 96 pocillos a  $26.5 \pm 0.5$  °C siguiendo el TG 236 de la OCDE (Prueba de toxicidad del embrión de peces (FET))<sup>86</sup>. Los compuestos se disolvieron en una solución de HEPES 9.95 mM, pH 7.2, y 1% de DMSO (dimetilsulfóxido).

El control del disolvente resultó ser tóxico a las 96 h, pero no a las 72 h. Por lo tanto, los experimentos duraron 72 h en lugar de 96 h. Fueron evaluados cuatro criterios de valoración letales: embriones coagulados, formación de somitas, desprendimiento de la cola y ausencia de latidos cardiacos. Todas estas características se registraron cada 24 h desde el comienzo del experimento, excepto el latido del corazón, visible después de 48 horas post-fecundación (hpf).

---

<sup>86</sup> OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2013.

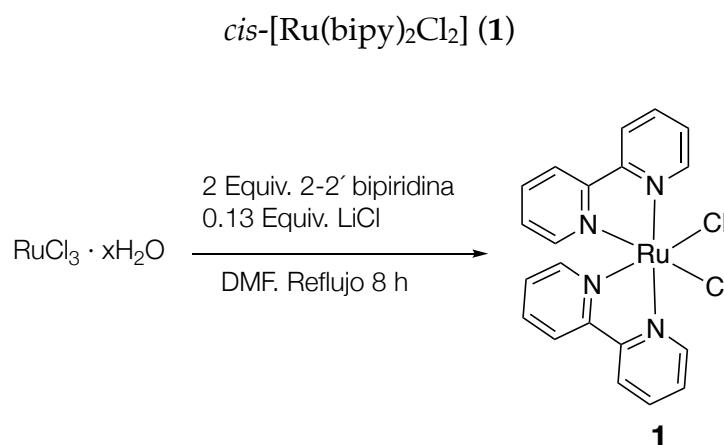


### 3.3. Síntesis de los compuestos.

Todas las reacciones implicadas en la síntesis de los derivados de rutenio se realizaron en condiciones de atmósfera inerte.

#### 3.3.1. Síntesis de los compuestos mononucleares de rutenio derivados de bipyridina.

Previamente a la síntesis de los compuestos mononucleares y dinucleares de rutenio fue necesario sintetizar el precursor **1**, mediante una modificación del método de síntesis desarrollado por Meyer *et al*<sup>87</sup>.



Una mezcla del compuesto  $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (0.400 g, 1.910 mmol), bipyridina (0.560 g, 3.820 mmol) y LiCl (0.005 g, 0.128 mmol) en 5 mL de DMF, se refluje con agitación magnética durante 8 h. Una vez finalizado el reflujo, se deja enfriar a temperatura ambiente y a continuación se añaden 25 mL de acetona, precipitando en el seno de la disolución el producto deseado. El precipitado formado se separa por filtración, se lava con hexano (20 mL) y dietiléter (20 mL) y se seca a vacío.

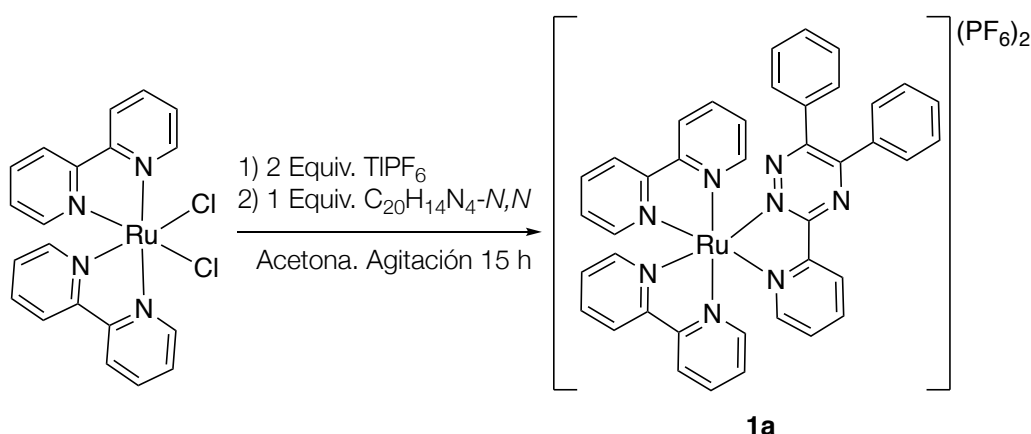
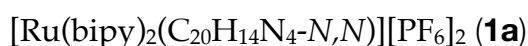
Sólido de color violeta oscuro. Rendimiento: 87%.

IR ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR): (bipy), 727m, 763f, 1457m, 1598d.

<sup>87</sup> B.P. Sullivan, D.J. Salmon, T.J. Meyer. *Inorg. Chem.* **1978**, 17, 3334.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.98 [d, 1H,  $J=8.0$ ]; 8.65 [d, 1H,  $J=4.8$ ]; 8.49 [d, 1H,  $J=7.8$ ]; 8.05 [t, 1H,  $J=7.6$ ]; 7.77 [t, 1H,  $J=5.9$ ]; 7.67 [t, 1H,  $J=7.5$ ]; 7.54 [d, 1H,  $J=5.2$ ]; 7.18 [t, 1H,  $J=5.9$ ].

### Síntesis del compuesto 1a.



Una suspensión del compuesto **1** (0.209 g, 0.500 mmol),  $\text{TlPF}_6$  (0.350 g, 1.000 mmol) y 3-(piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina (0.186 g, 0.600 mmol) se agitó a reflujo en metanol (25 mL) durante 9 h. Finalizada la reacción, se filtra la disolución a través de celita para eliminar el cloruro de talio. El filtrado se lleva a sequedad y el sólido obtenido se lava con dietiléter (5 mL) y posteriormente con hexano (5 mL).

Sólido de color rojo. Rendimiento: 79%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{RuC}_{40}\text{H}_{30}\text{F}_{12}\text{N}_8\text{P}_2 \cdot 1.1 \text{ CH}_2\text{Cl}_2$ : C, 44.2; H, 2.8; N, 10.0. Experimental: C, 44.6; H, 2.9; N, 10.2.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR):  $(\text{PF}_6)$ , 804m.

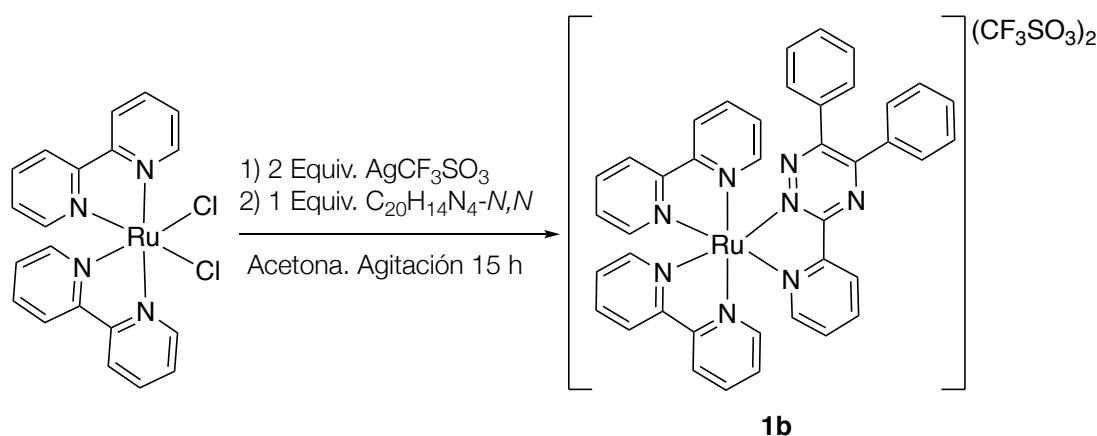
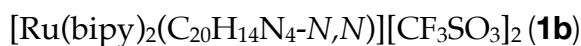
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.94 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.1$ ]; 8.90 [d, 2H,  $^3J(\text{HH})=7.6$ ]; 8.78 [t, 2H,  $^3J(\text{HH})=7.3$ ]; 8.18 [m, 6H]; 7.94 [m, 2H]; 7.85 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=6$ ]; 7.58 [m, 12H]; 7.25 [t, 2H,  $^3J(\text{HH})=7.7$ ]; 7.05 [d, 2H,  $^3J(\text{HH})=7.9$ ].

**RMN  $^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$**  (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): -145.0 [m,  $\text{PF}_6$ ].

**ESI-MS:**  $m/z = 362.09$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4)]^+$ ;  $869.12$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4)(\text{PF}_6)]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 79.4 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

### Síntesis del compuesto 1b.



Una suspensión del compuesto **1** (0.187 g, 0.385 mmol) y  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$  (0.229 g, 0.770 mmol) en 20 mL de acetona se agita a temperatura ambiente durante 1h. Transcurrido este tiempo se añade 3-(piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina (0.119 g, 0.385 mmol) y se agita nuevamente a temperatura ambiente durante 15 h. Finalizada la reacción, se filtra la disolución a través de celita para eliminar el cloruro de plata formado. El filtrado se lleva a sequedad y el sólido obtenido se lava con dietiléter (5 mL) y posteriormente con hexano (5 mL).

Sólido de color rojo. Rendimiento: 80%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{RuC}_{42}\text{H}_{30}\text{F}_6\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2 \cdot 1.1 \text{ CH}_2\text{Cl}_2$ : C, 45.9; H, 3.0; N, 10.0; S, 6.0. experimental: C, 46.4; H, 2.9; N, 10.0; S, 5.8.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR):  $(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ , 1029f; 1155m; 1222d; 1261f.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.95 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.2$ ]; 8.90 [d, 2H,  $^3J(\text{HH})=8$ ]; 8.79 [t, 2H,  $^3J(\text{HH})=7.3$ ]; 8.25 [m, 6H]; 7.97 [m, 2H]; 7.88 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.5$ ]; 7.75 [m, 4H]; 7.68 [t, 1H,  $^3J(\text{HH})=6.9$ ]; 7.62 [t, 1H,  $^3J(\text{HH})=6.3$ ]; 7.56 [m, 3H]; 7.46 [m, 3H]; 7.33 [t, 2H,  $^3J(\text{HH})=7.6$ ]; 7.12 [d, 2H,  $^3J(\text{HH})=7.7$ ].

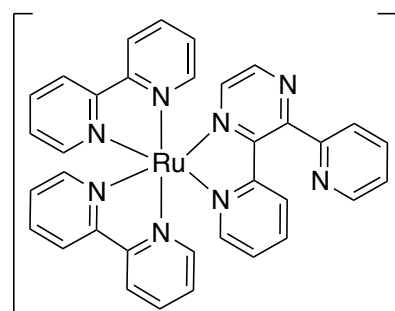
**ESI-MS:**  $m/z = 362.08$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4)]^+$ ;  $873.11$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 81.2 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

### Síntesis de los compuestos 1c-1e.

Los compuestos **1c-1e** han sido preparados mediante el mismo método de síntesis que el derivado **1b**. A continuación se detallan las cantidades de reactivos que se utilizaron para su obtención, y los datos experimentales correspondientes de cada derivado.

	Compuesto1	$\text{AgCF}_3\text{SO}_3$	Ligando
1c	0.219 g, 0.454 mmol	0.233 g, 0.908 mmol	0.1069 g, 0.454mmol
1d	0.219 g, 0.454 mmol	0.233 g, 0.908 mmol	0.089 g, 0.454 mmol
1e	0.179 g, 0.372 mmol	0.191 g, 0.743 mmol	0.079 g, 0.372 mmol



**1c**

$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  Sólido de color violeta . Rendimiento: 80%

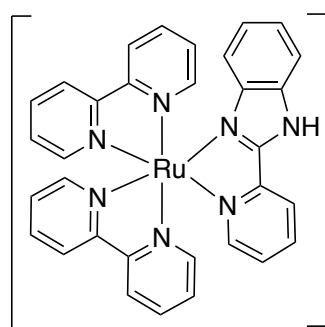
**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{RuC}_{36}\text{H}_{26}\text{F}_6\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2 \cdot 0.9 \text{ CH}_2\text{Cl}_2$  C, 43.8; H, 2.9; N, 10.8; S, 7.0. experimental: 43.4; H, 2.7; N, 11.0; S, 6.3.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR):  $(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ , 1030f; 1157f; 1224m; 1259f.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.87 [m, 4H]; 8.69 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=4.7$ ]; 8.65 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.1$ ]; 8.25 [m, 4H]; 8.05 [d, 2H,  $J(\text{HH})=5.1$ ]; 7.79 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.2$ ]; 7.70 [m, 8H]; 7.62 [m, 3H]; 7.45 [t, 1H,  $^3J(\text{HH})=6.8$ ]; 7.14 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.5$ ].

**ESI-MS:**  $m/z = 324.06$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4)]^+$  ;  $797.09$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 73.6 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

**1d**

(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Sólido de color naranja. Rendimiento: 82%.

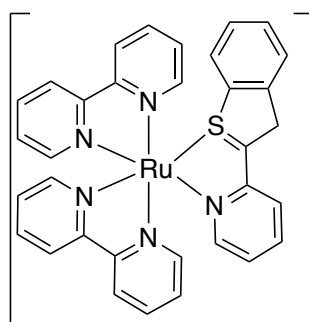
**Análisis elemental.** Calculado para RuC<sub>34</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>F<sub>6</sub>S<sub>2</sub>O<sub>6</sub> · 1/3 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C, 44.0; H, 3.0; N, 10.3. experimental C, 44.1; H, 2.8; N, 10.5.

**IR** (cm<sup>-1</sup>, FTIR): (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), 1031f; 1165m; 1226d; 1258f.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 14.98 [s, 1H]; 8.85 [m, 3H]; 8.76 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=8.1]; 8.57 [d, 1H, 7.6]; 8.25 [m 2H]; 8.17 [m, 2H]; 8.12 [t, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=7.9, <sup>4</sup>J(HH)=1.5]; 7.96 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=5.8]; 7.85 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=4.4]; 7.82 [m, 3H]; 7.72 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=5.1]; 7.60 [t, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=6.0]; 7.53 [m, 4H]; 7.40 [t, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=7.7]; 7.06 [t, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=7.2]; 5.67 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=8.4].

**ESI-MS:** m/z = 304.56 [Ru(bpy)<sub>2</sub>(C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>; 608.12 [Ru(bpy)<sub>2</sub>(C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>)(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>.

**Conductividad molar específica:** Λ<sub>m</sub> = 70.8 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> (en etanol).

**1e**

(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Sólido de color rojo. Rendimiento: 80%.

**Análisis elemental.** Calculado para RuC<sub>35</sub>H<sub>25</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>3</sub>: C, 45.5; H, 2.5; N, 7.6; S, 10.0. Experimental: C, 46.0; H, 2.7; N, 7.6; S, 10.4.

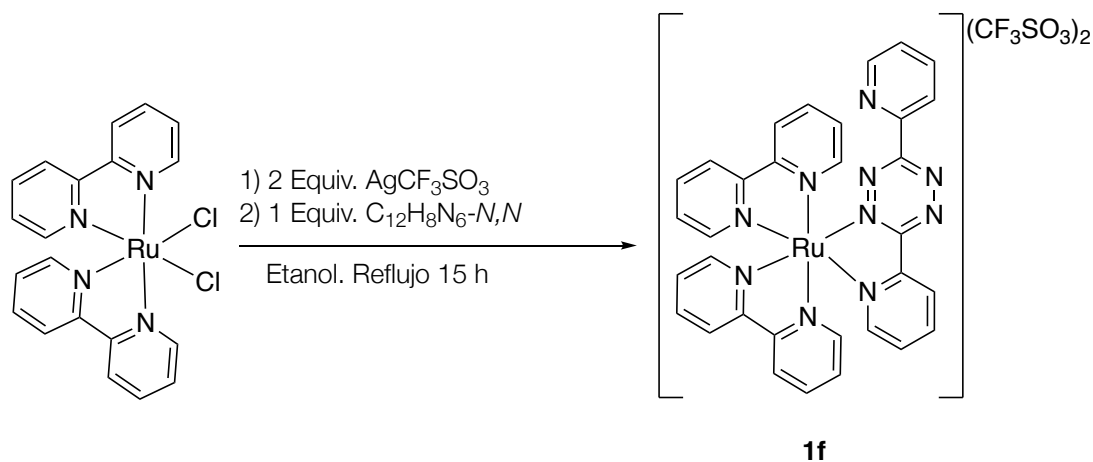
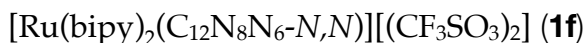
**IR** (cm<sup>-1</sup>, FTIR): (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), 1031f; 1165m; 1226m; 1265f.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm, J Hz): 9.52 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=5.2]; 9.04 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=8.2]; 8.98 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=8.1]; 8.43 [m, 3H]; 8.23 [m, 1H]; 8.18 [td, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=7.8, <sup>4</sup>J(HH)=1.5]; 8.08 [m, 2H]; 7.9 [m, 4H]; 7.75 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=7.9]; 7.69 [m, 2H]; 7.51 [m, 2H]; 7.46 [m, 1H]; 7.39 [m, 1H]; 7.33 [m, 1H]; 7.24 [m, 2H]; 7.00 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=8].

**ESI-MS:** m/z = 312.55 [Ru(bpy)<sub>2</sub>(C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NS)]<sup>+</sup>.

**Conductividad molar específica:** Λ<sub>m</sub> = 76.1 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> (en etanol).

## Síntesis del compuesto 1f.



A una disolución del compuesto **1** (0.209 g, 0.413 mmol) en 40 mL de acetona, se le añade  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$  (0.212 g, 0.826 mmol). La mezcla resultante se agita durante 2 h a temperatura ambiente, al cabo de las cuales se filtra a través de celita para eliminar el precipitado de  $\text{AgCl}$ . Se elimina el disolvente en el rotavapor y se obtuvo un sólido que se disuelve en 26 mL de etanol, y a continuación se añade el ligando 3, 6-di-2-piridil-1, 2, 4, 5-tetrazina (0.097 g, 0.413 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo con agitación durante 15 h. Finalizada la reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y se elimina el disolvente en el rotavapor, dando lugar a la obtención del producto final. Sólido de color violeta. Rendimiento: 70%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{F}_6\text{N}_{10}\text{O}_6\text{RuS}_2$ : C, 43.1; H, 2.5; N, 14.8. Experimental: C, 43.1; H, 2.4; N, 14.5.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR):  $(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ , 1029f; 1156f; 1224h; 1256f.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.01 [t, 2H,  $^3J(\text{HH})=6.7$ ]; 8.95 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=7.8$ ]; 8.82 [m, 2H]; 8.37 [m, 2H]; 8.25 [m, 5H]; 8.02 [t, 1H,  $^3J(\text{HH})=7.8$ ]; 7.95 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5,0$ ]; 7.79 [m, 5H]; 7.65 [m, 3H]; 7.55 [m, 2H].

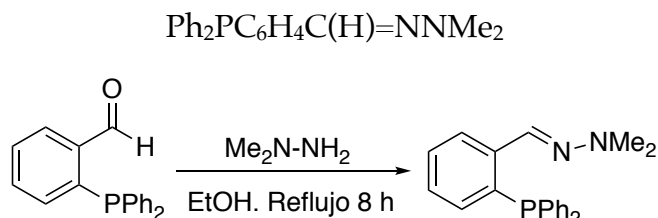
**MS-FAB:**  $m/z$  = 799.1  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ ; 650.1  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6)]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 77.4 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

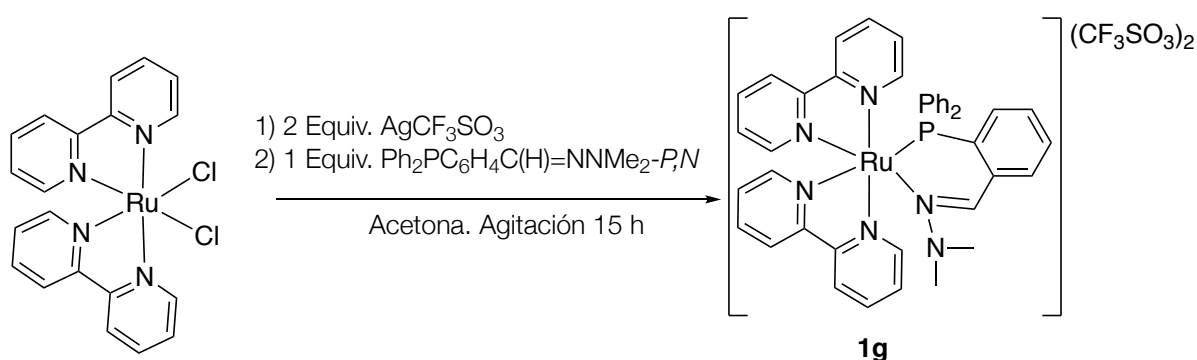
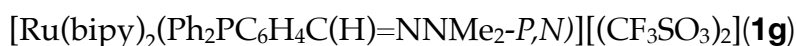


## Síntesis del compuesto 1g.

Previamente a la síntesis del compuesto **1g**, fue necesario sintetizar la fosfinoamina  $\text{Ph}_2\text{PC}_6\text{H}_4\text{C(H)=NNMe}_2$  mediante una reacción habitual de condensación de bases de Schiff.



En un balón de 100 cm<sup>3</sup> se introducen 0.150 g (0.520 mmol) de 2-difenilfosfinobenzaldehído disolviéndose en 20 ml de *N,N*-dimetilhidrazina. La disolución resultante se refluje con agitación mecánica durante 4 h, bajo atmósfera de nitrógeno, transcurridas las cuales se enfría a temperatura ambiente, eliminando el exceso de amina a vacío, y dando lugar a la obtención de un denso aceite de color marrón. Rendimiento: 85%.



A una disolución del compuesto **1** (0.209 g, 0.413 mmol) en 40 mL de acetona, se le añade  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$  (0.212 g, 0.826 mmol). La mezcla resultante se agita durante 2 h a temperatura ambiente, al cabo de las cuales se filtra a través de celita para eliminar el

precipitado de AgCl. Se elimina el disolvente en el rotavapor y se obtuvo un sólido que se disuelve en 26 mL de etanol, y a continuación se añade el ligando  $\text{Ph}_2\text{PC}_6\text{H}_4\text{C(H)=NNMe}_2$  (0.137 g, 0.413 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo con agitación durante 15 h. Finalizada la reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y se elimina el disolvente en el rotavapor, dando lugar a la obtención del producto final.

Sólido de color amarillo. Rendimiento: 82%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{C}_{43}\text{H}_{37}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_6\text{PRuS}_2$ : C, 49.5; H, 3.6; N, 8.0. Experimental: C, 49.1; H, 3.4; N, 8.0.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR): (C=N), 1604d; ( $\text{CF}_3\text{SO}_3$ ), 1028f; 1153f; 1223h; 1255f.

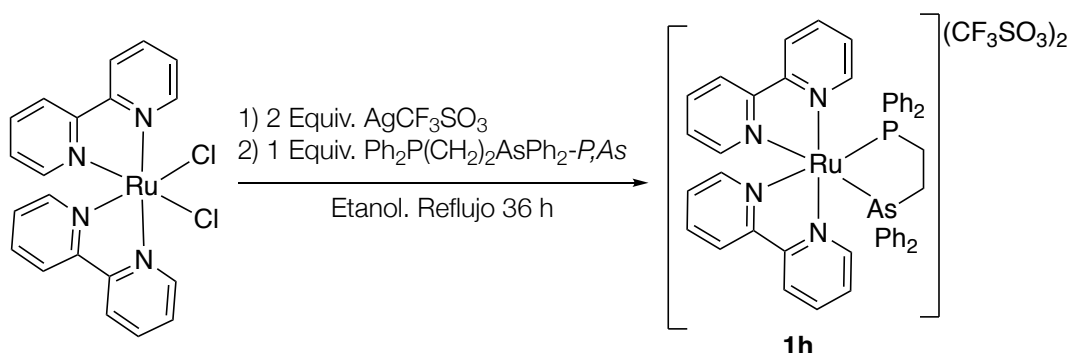
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.23 [s, 1H, HCN]; 8.79 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=7.8$ ]; 8.75 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.0$ ]; 8.37 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.0$ ]; 8.31 [m, 3H]; 8.20 [m, 2H]; 8.09 [m, 2H]; 8.02 [t, 1H,  $^3J(\text{HH})=6.3$ ]; 7.90 [m, 3H]; 7.55 [m, 4H]; 7.42 [m, 5H]; 7.24 [m, 2H]; 7.13 [t, 1H,  $^3J(\text{HH})=6.1$ ]; 6.83 [t, 2H,  $^3J(\text{HH})=5.6$ ]; 6.23 [t, 2H,  $^3J(\text{HH})=6.0$ ]; 2.09 [s, 6H,  $\text{NMe}_2$ ].

**RMN  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 52.2 [s].

**MS-FAB:**  $m/z$  = 895.1  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{PC}_6\text{H}_4\text{C(H)=NNMe}_2)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ ; 746.2  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{PC}_6\text{H}_4\text{C(H)=NNMe}_2)]^+$ ; 702.2  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{PC}_6\text{H}_4\text{C(H)=N})]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 80.3 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

## Síntesis del compuesto 1h.



A una disolución del compuesto precursor **1** (0.209 g, 0.413 mmol) en 40 mL de acetona, se le añade  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$  (0.212 g, 0.826 mmol). La mezcla resultante se agita durante 2 h a temperatura ambiente, al cabo de las cuales se filtra a través de celita para eliminar el precipitado de  $\text{AgCl}$ . Se elimina el disolvente en el rotavapor y se obtuvo un sólido que se disuelve en 26 mL de etanol, y a continuación se añade el ligando  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{AsPh}_2$  (0.183 g, 0.413 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo con agitación durante 36 h. Finalizada la reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y se elimina el disolvente en el rotavapor, dando lugar a la obtención del producto final que se lavó con dos porciones de etanol (2.5 mL) y 2 porciones de éter (2.5 mL).

Sólido de color naranja. Rendimiento: 84%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{C}_{48}\text{H}_{40}\text{AsF}_6\text{N}_4\text{O}_6\text{PRuS}_2$ : C, 49.9; H, 3.5; N, 4.9. Experimental: C, 49.8; H, 3.4; N, 5.0.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR): ( $\text{CF}_3\text{SO}_3$ ), 1030f; 1148f; 1225h; 1262f.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.69 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.2$ ]; 8.40 [t, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.2$ ]; 8.22 [m, 1H]; 7.86 [m, 3H]; 7.47 [m, 6H]; 7.08 [m, 1H]; 6.91 [m, 3H]; 6.54 [m, 2H]; 3.44 [m, 1H,  $\text{PCH}_2$ ]; 3.00 [m, 1H,  $\text{AsCH}_2$ ].

**RMN  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 65.5 [s].

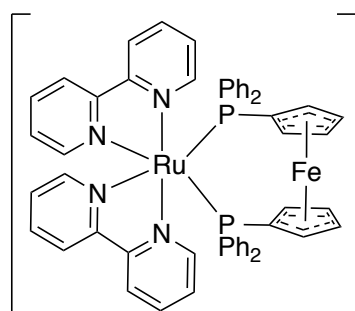
**MS-FAB:**  $m/z = 1005.1$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{AsPh}_2)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ ; 856.1  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{AsPh}_2)]^+$ ; 702.05  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{As})]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 71.9 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

### Síntesis de los compuestos 1i-1j.

Los compuestos **1i-1j** han sido preparados mediante un procedimiento similar al del derivado **1h**, con la diferencia de que la adición del ligando fosfina se hace en una mezcla etanol/tolueno (20 mL / 20 mL). A continuación se detallan las cantidades de reactivos que se utilizaron para su obtención, y los datos experimentales correspondientes a cada derivado.

	Compuesto1	$\text{AgCF}_3\text{SO}_3$	Ligando
1i	0.209 g, 0.413 mmol	0.212 g, 0.826 mmol	0.229 g, 0.413 mmol
1j	0.500 g, 1.032 mmol	0.5304 g, 2.064 mmol	0.438 g, 1.032 mmol



**1i**

$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  Sólido de color naranja. Rendimiento: 84%.

#### Análisis elemental.

Calculado para  $\text{C}_{56}\text{H}_{44}\text{F}_6\text{FeN}_4\text{O}_6\text{P}_2\text{RuS}_2$ : C, 53.1; H, 3.5; N, 4.4. Experimental: C, 53.2; H, 3.4; N, 4.2.

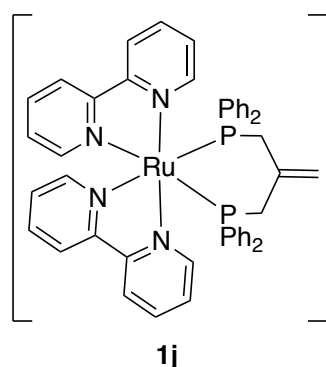
**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR):  $(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ , 1028f; 1144f; 1224h; 1255f.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.56 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.4$ ]; 8.50 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.1$ ]; 8.28 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.2$ ]; 8.17 [m, 2H]; 7.74 [m, 2H]; 7.74 [m, 2H]; 7.30 [m, 3H]; 7.18 [m, 2H]; 7.10 [t, 2H  $^3J(\text{HH})=6.63$ ]; 6.91 [t, 2H,  $^3J(\text{HH})=8.5$ ]; 5.32 [s, 1H,  $\text{C}_5\text{H}_4$ ]; 4.95 [s, 1H,  $\text{C}_5\text{H}_4$ ]; 4.65 [s, 1H,  $\text{C}_5\text{H}_4$ ]; 4.39 [s, 1H,  $\text{C}_5\text{H}_4$ ].

**RMN  $^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 33.0 [s].

**MS-FAB:**  $m/z = 1266.0$   $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Ph}_2\text{PC}_5\text{H}_4\text{FeC}_5\text{H}_4\text{PPh}_2)(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]^+$ ; 1116.9  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{PC}_5\text{H}_4\text{FeC}_5\text{H}_4\text{PPh}_2)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ ; 967.0  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{PC}_5\text{H}_4\text{FeC}_5\text{H}_4\text{PPh}_2)]^+$ ; 812.0  $[\text{Ru}(\text{bipy})(\text{Ph}_2\text{PC}_5\text{H}_4\text{FeC}_5\text{H}_4\text{PPh}_2)]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 282.4 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en acetonitrilo).



$(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  Sólido de color amarillo. Rendimiento: 71%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{C}_{50}\text{H}_{42}\text{F}_6\text{FeN}_4\text{O}_6\text{P}_2\text{RuS}_2$ : C, 52,8; H, 3,4; N, 4,9. Experimental: C, 52,3; H, 3,1; N, 4,8.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR):  $(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ , 1029f; 1150f; 1224h; 1260f.

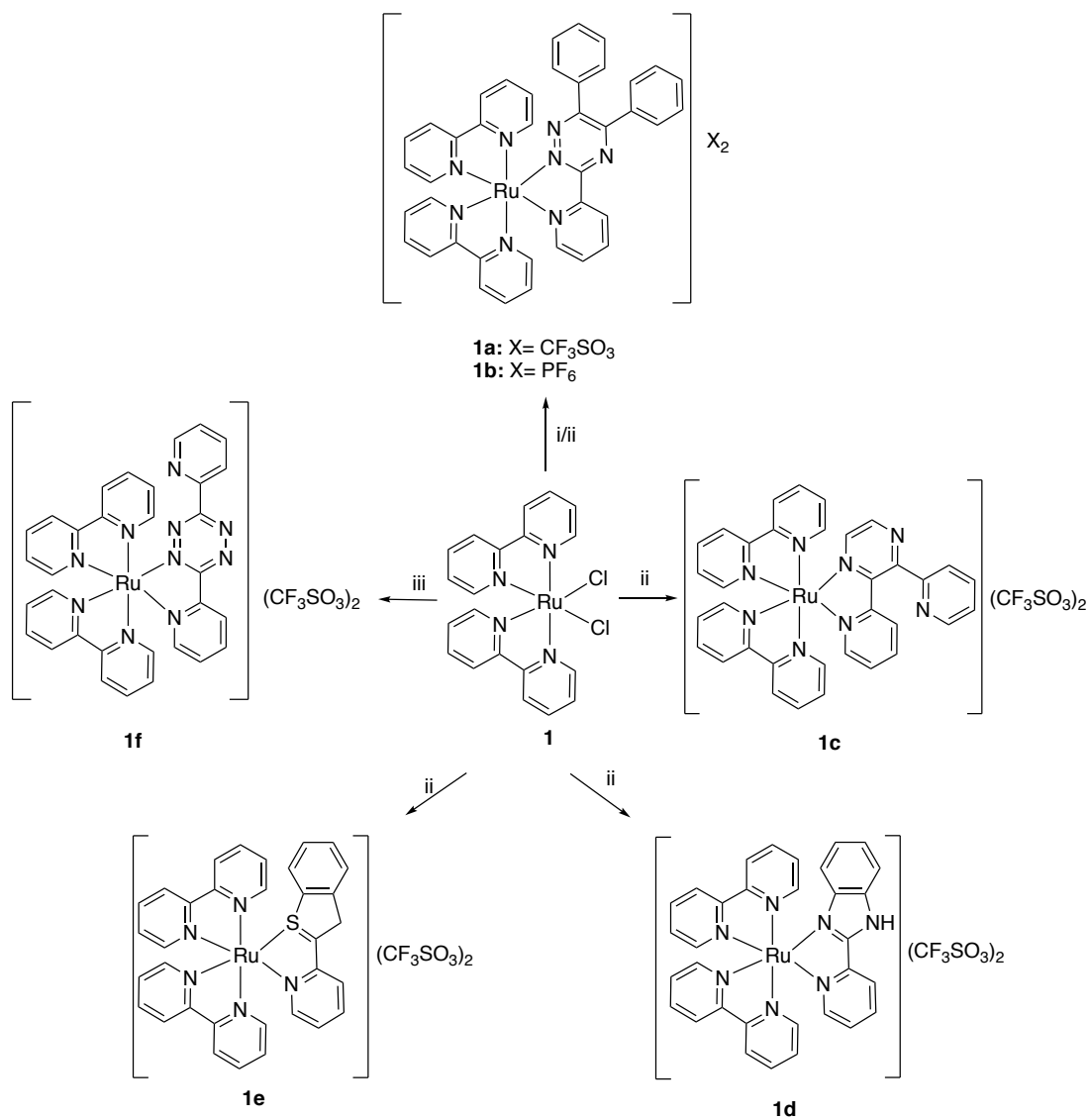
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.54 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.7$ ]; 8.06 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.1$ ]; 7.94 [m, 3H]; 7.82 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.7$ ]; 7.70 [m, 2H]; 7.59 [m, 4H]; 7.28 [td, 1H,  $^3J(\text{HH})=6.1$ ,  $^4J(\text{HH})=2.8$ ]; 7.08 [t, 1H,  $^3J(\text{HH})=7.5$ ]; 6.76 [t, 2H,  $^3J(\text{HH})=6.4$ ]; 6.37 [m, 2H,]; 4.00 [m, 1H,  $\text{C}=\text{CH}_2$ ]; 3.70 [m, 2H,  $\text{PCH}_2$ ].

**RMN  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 21.7 [s].

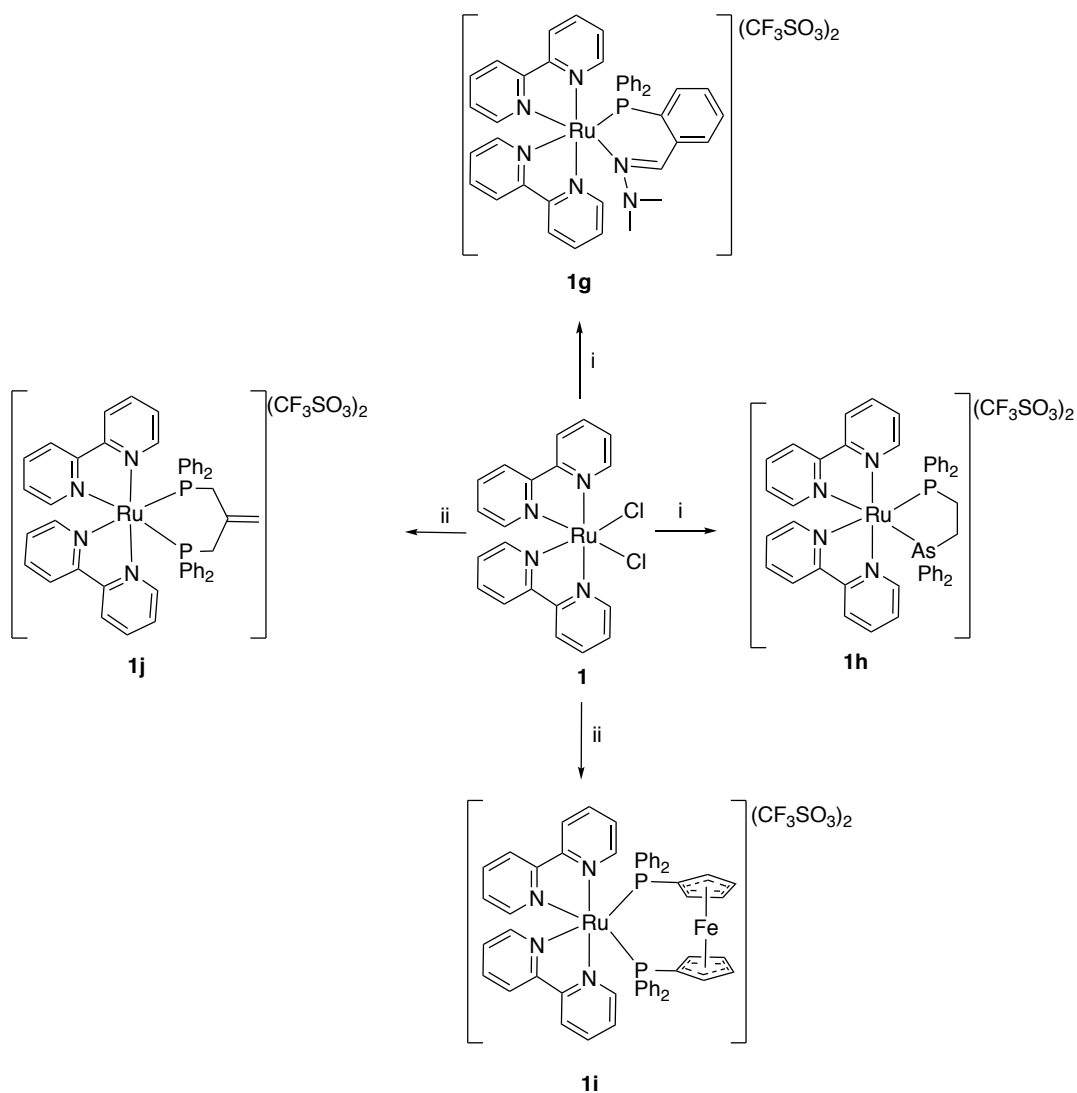
**MS-FAB:**  $m/z=987.3$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{PPh}_2)(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]^+$ ; 838.3  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{PPh}_2)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ ; 682.1  $[\text{Ru}(\text{bipy})(\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{PPh}_2)]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 68.3 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

## Esquemas de los compuestos mononucleares de rutenio derivados de bipyridina.



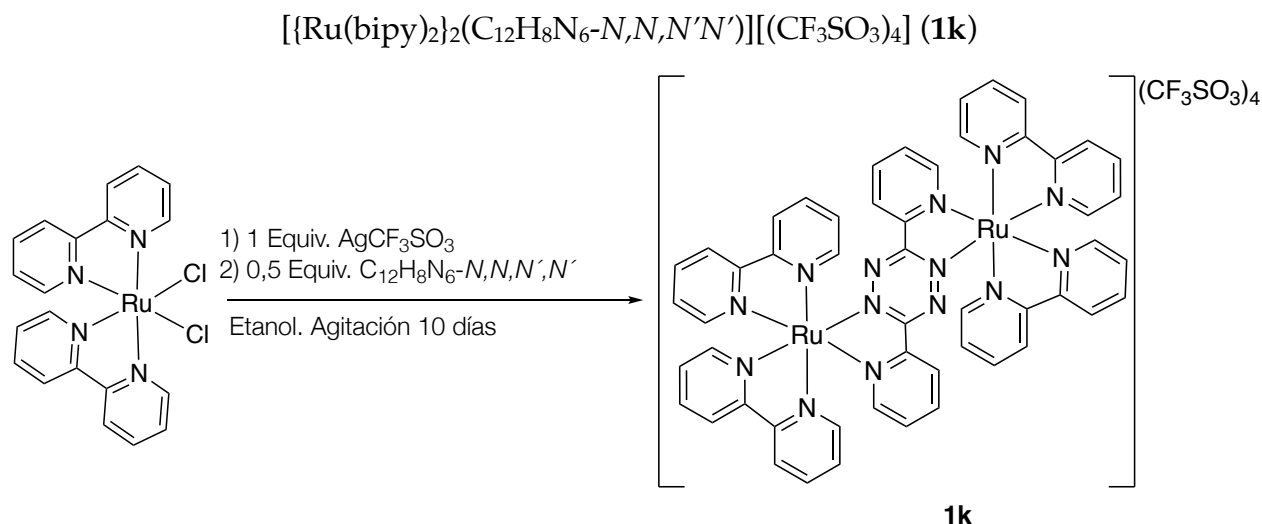
**Esquema 1:** (i) 1) TIPF<sub>6</sub> (MeOH); 2) C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub> (**1a**)  
 (ii) 1) AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> (acetona)  
 2) C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub> (**1b**), C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub> (**1c**), C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub> (**1d**), C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NS (**1e**)  
 (iii) 1) AgCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> (acetona)  
 2) C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>6</sub> (**1f**) (etanol)



**Esquema 2:** (i) 1)  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$  (acetona)  
 2)  $\text{Ph}_2\text{PC}_6\text{H}_4\text{C(H)=NNMe}_2$  [**1g**],  $\text{Ph}_2\text{P(CH}_2)_2\text{AsPh}_2$  (etanol) [**1h**] (EtOH)  
 (ii) 1)  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$  (acetona)  
 2)  $\text{Ph}_2\text{PC}_5\text{H}_4\text{FeC}_5\text{H}_4\text{PPh}_2$  [**1i**],  $\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{C(=CH}_2)_2\text{CH}_2\text{PPh}_2$  [**1j**] (EtOH/tolueno)

### 3.3.2. Síntesis de los compuestos dinucleares de rutenio derivados de bipyridina.

#### Síntesis del compuesto 1k.



A una disolución del compuesto **1** (0.200 g, 0.413 mmol) en 40 mL de acetona se añade  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$  (0.106 g, 0.413 mmol). Tras dejar agitando 2 h a temperatura ambiente, se observa la aparición de  $\text{AgCl}$  que se filtra a través de celita. El filtrado se llevó a sequedad en el rotavapor y el sólido obtenido se disuelve en 20 mL de etanol, añadiendo a continuación el ligando, bis(2-piridil)-1,2,4,5-tetrazina (0.049 g, 0.206 mmol). La mezcla de reacción se agita durante 10 días a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente en el rotavapor obteniéndose el producto final.

Sólido de color azul oscuro. Rendimiento: 90%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{C}_{56}\text{H}_{40}\text{F}_{12}\text{N}_{14}\text{O}_{12}\text{Ru}_2\text{S}_4$ : C, 43.5; H, 2.4; N, 11.8. Experimental: C, 43.1; H, 2.4; N, 11.7.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR):  $(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ , 1028f; 1148f; 1223f; 1254f.

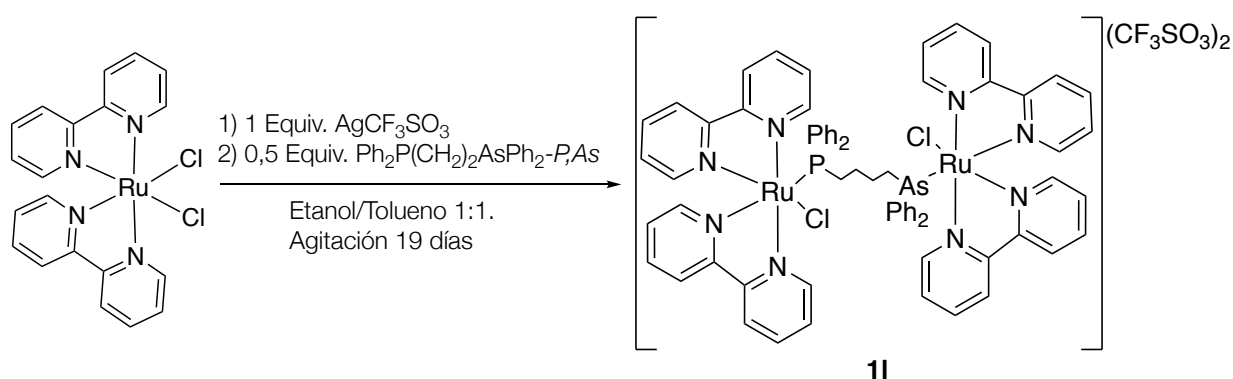
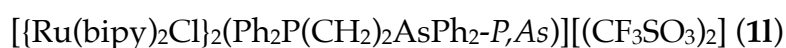
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.12 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.7$ ]; 9.03 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.7$ ]; 8.97 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.7$ ]; 8.93 [m, 1H]; 8.84 [m, 5H]; 8.55 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.2$ ]; 8.45-8.05 [m, 15H]; 7.90 [m, 5H]; 7.70 [m, 10H].



**MS-FAB:**  $m/z = 1362.0$ ,  $[\text{Ru}_2(\text{bpy})_4(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6)(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]$ ;  $1213.1$   $[\text{Ru}_2(\text{bpy})_4(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ ;  $1064.8$   $[\text{Ru}_2(\text{bipy})_4(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6)]^+$ ;  $799.1$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ ;  $650.1$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6)]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 165.4 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

### Síntesis del compuesto 11.



A una disolución del compuesto **1** (0.200 g, 0.413 mmol) en 40 mL de acetona se añade  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$  (0.106 g, 0.413 mmol). Tras dejar agitando 2 h a temperatura ambiente, se observa la aparición de  $\text{AgCl}$  que se filtra a través de celita. El filtrado se llevó a sequedad en el rotavapor y el sólido obtenido se disuelve en 20 mL de etanol, añadiendo a continuación el ligando,  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{AsPh}_2$  (0.091 g, 0.206 mmol) disuelto en 20 mL de tolueno. La mezcla de reacción se agita durante 19 días a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente en el rotavapor obteniéndose el producto final que se lavó con dos porciones de éter (5 mL).

Sólido de color rojo. Rendimiento: 74%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{C}_{68}\text{H}_{56}\text{AsCl}_2\text{F}_6\text{N}_8\text{O}_6\text{PRu}_2\text{S}_2$ : C, 49.8; H, 3.4; N, 6.8. Experimental: C, 49.7; H, 3.4; N, 6.7.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR):  $(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ , 1028f; 1151f; 1223d; 1256f.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.45 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.9$ ]; 9.24 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.7$ ]; 8.97 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.7$ ]; 8.65 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=5.6$ ]; 8.38 [d, 1H,  $^3J(\text{HH})=8.2$ ]; 8.28 [m, 3H]; 8.10-7.75 [m, 10H]; 7.70-7.45 [m, 13H]; 7.35-7.10 [m, 11H]; 7.04 [m, 4H]; 6.85 [m, 2H]; 6.32 [m, 4H]; 5.30 [m, 4H,  $\text{CH}_2$ ].

**RMN  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 44.9 [s].

**MS-FAB:**  $m/z=1639.2$  [ $\text{Ru}_2(\text{bipy})_4(\text{Cl})_2(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{AsPh}_2)(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ ] $^+$ ; 1489.2

$[\text{Ru}_2(\text{bipy})_4(\text{Cl})_2(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{AsPh}_2)(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$ ; 1339.9

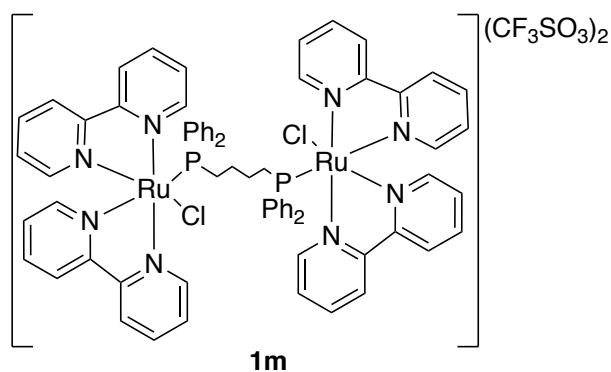
$[\text{Ru}_2(\text{bipy})_4(\text{Cl})_2(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{AsPh}_2)]^+$ ; 891.0 [ $\text{Ru}(\text{bipy})(\text{Cl})(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{AsPh}_2)$ ]

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 78.8 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

## Síntesis de los compuestos 1m y 1n.

Los compuestos **1m** y **1n** han sido preparados mediante el mismo método de síntesis que el derivado **1l**; a continuación se detallan las cantidades de reactivos que se utilizaron para su obtención, y los datos experimentales correspondientes de cada derivado.

	Compuesto1	$\text{AgCF}_3\text{SO}_3$	Ligando
1n	0.200 g, 0.413 mmol	0.106 g, 0.413 mmol	0.088 g, 0.206 mmol
1m	0.200 g, 0.413 mmol	0.106 g, 0.413 mmol	0.114 g, 0.206 mmol



Sólido de color rojo. Rendimiento: 84%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $C_{70}H_{60}Cl_2F_6N_8O_6P_2Ru_2S_2$ : C, 51.8; H, 3.7; N, 6.9. Experimental: C, 51.3; H, 3.6; N, 6.8.

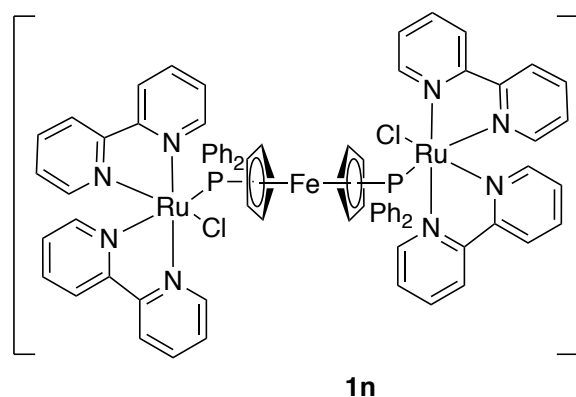
**IR** ( $cm^{-1}$ , FTIR):  $(CF_3SO_3)$ , 1030f; 1148f; 1224d; 1260f.

**RMN  $^1H$**  (300 MHz,  $CD_2Cl_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 9.36 [d, 2H,  $^3J(HH)=5.6$ ]; 8.08 [d, 2H,  $^3J(HH)=5.8$ ]; 8.68 [t, 4H,  $^3J(HH)=8.8$ ]; 8.45 [d, 2H,  $^3J(HH)=7.7$ ]; 8.11 [m, 6H]; 8.02 [td, 2H,  $^3J(HH)=7.9$ ,  $^4J(HH)=1.6$ ]; 7.65-7.15 [m, 24H]; 7.02 [m, 4H]; 6.91 [m, 2H]; 6.74 [m, 4H]; 3.50 [m, 8H,  $CH_2$ ].

**RMN  $^{31}P\{-^1H\}$**  (300 MHz,  $CD_2Cl_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 38.34 [s].

**MS-FAB:**  $m/z$  = 1474.9  $[Ru_2(bipy)_4(Cl)_2(Ph_2P(CH_2)_4)Ph_2P](CF_3SO_3)]^+$ ; 1324.1  $[Ru_2(bipy)_4(Cl)_2(Ph_2P(CH_2)_4)Ph_2P]^+$ ; 875.2  $[Ru(bipy)_2(Cl)(Ph_2P(CH_2)_4)Ph_2P]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 74.2 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).



$(CF_3SO_3)_2$  Sólido de color rojo. Rendimiento: 86%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $C_{76}H_{60}Cl_2F_6FeN_8O_6P_2Ru_2S_2$ : C, 52.1; H, 3.6; N, 6.4. Experimental: C, 52.0; H, 3.2; N, 6.2.

**IR** ( $cm^{-1}$ , FTIR):  $(CF_3SO_3)$ , 1029f;

1156f; 1222d; 1254f.

**RMN  $^1H$**  (300 MHz,  $CD_2Cl_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.93 [d, 1H,  $^3J(HH)=5.6$ ]; 8.89 [d, 1H,  $^3J(HH)=5.8$ ]; 8.83 [d, 1H,  $^3J(HH)=5.6$ ]; 8.79 [d, 1H,  $^3J(HH)=5.7$ ]; 8.42 [t, 2H,  $^3J(HH)=7.3$ ]; 8.38 [d, 2H,  $^3J(HH)=7.3$ ]; 8.25 [m, 4H]; 7.98 [m, 4H]; 7.87 [m, 4H]; 7.76 [td, 1H,  $^3J(HH)=7.8$ ,  $^4J(HH)=1.4$ ]; 7.70 [td, 1H,  $^3J(HH)=7.7$ ,  $^4J(HH)=1.4$ ]; 7.55-7.40 [m, 7H];

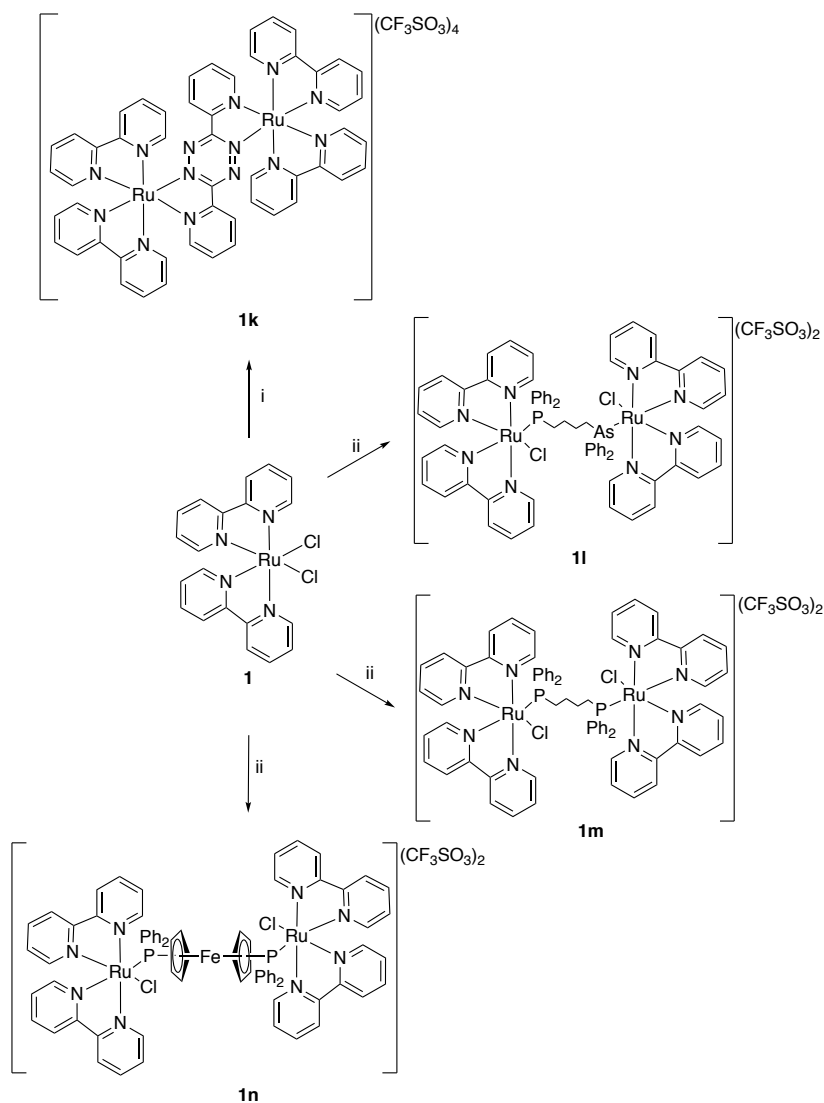
7.35-7.00 [m, 21H]; 6.80 [m, 2H]; 3.71 [C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>, s, 1H]; 3.63 [C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>, s, 1H]; 3.59 [C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>, s, 2H]; 3.40 [C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>, s, 1H]; 3.18 [C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>, s, 1H]; 2.98 [C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>, s, 1H]; 2.77 [C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>, s, 1H].

RMN <sup>31</sup>P-{<sup>1</sup>H} (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, δ ppm, J Hz): 41.90 [s]; 41.72 [s].

MS-FAB: m/z = 1601.1 [Ru<sub>2</sub>(bipy)<sub>4</sub>(Ph<sub>2</sub>PC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>FeC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>PPh<sub>2</sub>)(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>; 1452.3 [Ru<sub>2</sub>(bipy)<sub>4</sub>(Ph<sub>2</sub>PC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>FeC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>PPh<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>.

Conductividad molar específica: Λ<sub>m</sub> = 67.1 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> (en etanol).

## Esquema de los compuestos dinucleares de rutenio derivados de bipyridina.

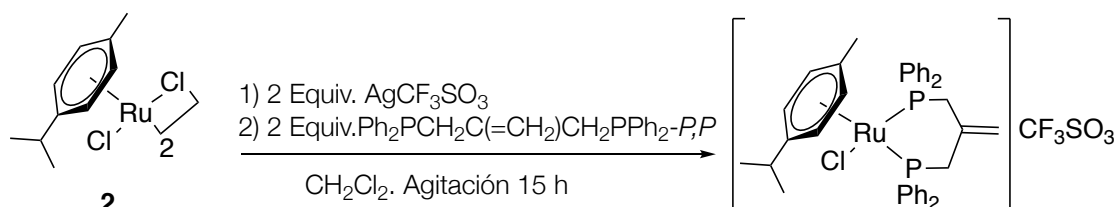
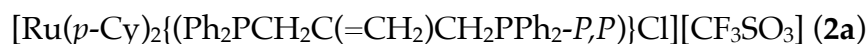


**Esquema 3:** (i) 1)  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$   
 2)  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6$  (EtOH)  
 (ii) 1)  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$   
 2)  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{AsPh}_2$  [**1l**],  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{PPh}_2$  [**1m**],  $\text{Ph}_2\text{PC}_5\text{H}_4\text{FeC}_5\text{H}_4\text{PPh}_2$  [**1n**], (Tolueno/ EtOH).



### 3.3.3. Síntesis de los compuestos mononucleares de rutenio derivados de paracimeno.

#### Síntesis del compuesto 2a.



En 40 mL de diclorometano seco se disuelven 0.200 g (0.326 mmol) de tetrachlorobis(*p*-cimeno)dirutenio(II), (compuesto **2**) y 0.168 g (0.654 mmol) de  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$ . Se burbujea una corriente de argón a través de la disolución durante cinco minutos y se agita durante 1 h. A continuación se añaden 0.276 g (0.652 mmol) del ligando  $\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{PPh}_2$  y de nuevo se agita durante 15 horas. Una vez finalizada la reacción, se filtra la disolución a través de celita para eliminar el cloruro de plata formado, y el filtrado se lleva a sequedad en el rotavapor obteniéndose el producto final.

Sólido amarillo. Rendimiento: 83%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{C}_{39}\text{H}_{40}\text{ClF}_3\text{O}_3\text{P}_2\text{RuS}$ : C, 55.5; H, 4.8. Experimental: C, 55.1; H, 4.4.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR): ( $\text{CF}_3\text{SO}_3$ ), 1030f; 1147f; 1224h; 1261f.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 7.76 [m, 4H,  $\text{H}_{\text{ar-}f\text{osfina}}$ ]; 7.60 [m, 8H,  $\text{H}_{\text{ar-}f\text{osfina}}$ ]; 7.5 [m, 4H,  $\text{H}_{\text{ar-}f\text{osfina}}$ ]; 7.38 [m, 4H,  $\text{H}_{\text{ar-}f\text{osfina}}$ ]; 5.90 [d, 2H,  $^3J(\text{HH})=8.4$ ,  $\text{H}_{\text{ar-}c\text{imeno}}$ ]; 5.57 [d, 2H,  $^3J(\text{HH})=6.2$ ,  $\text{H}_{\text{ar-}c\text{imeno}}$ ]; 4.74 [m, 2H,  $\text{C}=\text{CH}_2$ ]; 2.63 [m, 1H,  $\text{CHMe}_2$ ]; 1.10 [s, 3H, Me]; 0.80 [d, 6H,  $^3J(\text{HH})=7.0$ ,  $\text{CHMe}_2$ ].

**RMN  $^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 28.8.

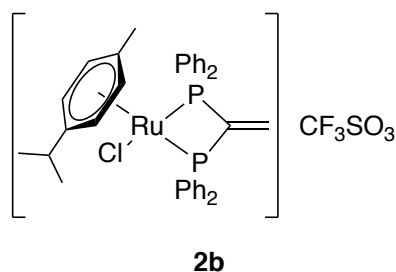
**MS-FAB:**  $m/z = 695.1$   $[\text{Ru}(p\text{-Cy})\{(\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{PPh}_2)\}\text{Cl}]^+$ ; 561.1;  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{PPh}_2)\text{Cl}]$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 41.0 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).

## Síntesis de los compuestos 2b-2d.

Los compuestos **2b-2d** han sido preparados mediante el mismo método de síntesis que el derivado **2a**. A continuación se detallan las cantidades de reactivos que se utilizaron para su obtención, y los datos experimentales correspondientes de cada derivado.

	Compuesto 2	$\text{AgCF}_3\text{SO}_3$	Ligando
2b	0.200 g, 0.326 mmol	0.233 g, 0.908 mmol	0.1069 g, 0.454mmol
2c	0.200 g, 0.326 mmol	0.233 g, 0.908 mmol	0,089 g, 0.454 mmol
2d	0.179 g, 0.372 mmol	0.191 g, 0.743 mmol	0.079 g, 0.3716 mmol



Sólido de color verde. Rendimiento: 86%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{ClF}_3\text{O}_3\text{P}_2\text{RuS}$ : C, 54.4; H, 4.4. Experimental: C, 54.1; H, 4.3.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ , FTIR):  $(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ , 1027f; 1155f; 1223h; 1255f.

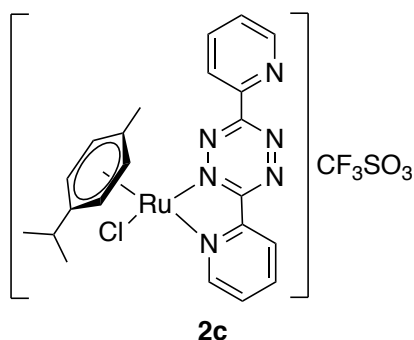
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 7.57 [m, 20H,  $H_{\text{ar-fosfina}}$ ]; 6.52 [m, 2H,  $\text{C}=\text{CH}_2$ ]; 6.02 [d, 2H,  $^3J(\text{HH})=6.2$ ,  $H_{\text{ar-cimeno}}$ ]; 5.90 [d, 2H,  $^3J(\text{HH})=6.0$ ,  $H_{\text{ar-cimeno}}$ ]; 2.47 [m, 1H,  $\text{CHMe}_2$ ]; 1.26 [s, 3H, Me]; 1.10 [d, 6H,  $^3J(\text{HH})=6.9$ ,  $\text{CHMe}_2$ ].

**RMN  $^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 20.5.

**MS-FAB:**  $m/z = 667.1$   $[\text{Ru}(p\text{-Cy})\{(\text{Ph}_2\text{PC}(\text{=CH}_2)\text{PPh}_2)\}\text{Cl}]^+$ .

**Conductividad molar específica:**  $\Lambda_m = 35.1 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (en etanol).





Sólido de color azul oscuro. Rendimiento: 87%.

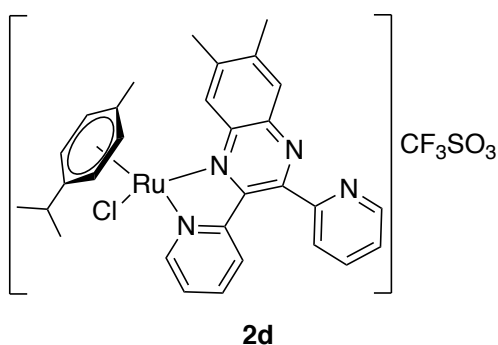
**Análisis elemental.** Calculado para  $C_{23}H_{22}ClF_3N_6O_3RuS$ : C, 42.1; H, 3.4; N, 12.8. Experimental: C, 42.2; H, 3.4; N, 12.7.

**IR** (cm<sup>-1</sup>, FTIR): (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), 1028f; 1148f; 1223h; 1254f.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, δ ppm, J Hz): 9.5 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=5.4]; 9.05 [m, 2H]; 8.79 [m, 1H]; 8.34 [td, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=7.9, <sup>4</sup>J(HH) 1.4]; 8.16 [m, 2H]; 7.70 [m, 1H]; 6.29 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=6.3, H<sub>ar-cimeno</sub>]; 6.23 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=6.3, H<sub>ar-cimeno</sub>]; 6.13 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=6.3, H<sub>ar-cimeno</sub>]; 6.05 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=6.3, H<sub>ar-cimeno</sub>]; 3.02 [m, 1H, CHMe<sub>2</sub>]; 2.31 [s, 3H, Me]; 1.36 [d, 3H, <sup>3</sup>J(HH)=2.1, CHMe]; 1.33 [d, 3H, <sup>3</sup>J(HH)=2.1, CHMe].

**MS-FAB:** m/z = 507.0 [Ru(p-Cy){(C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>6</sub>)}Cl]<sup>+</sup>.

**Conductividad molar específica:** Λ<sub>m</sub> = 34.4 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> (en etanol).



Sólido de color naranja. Rendimiento: 90%.

**Análisis elemental.** Calculado para  $C_{31}H_{30}ClF_3N_4O_3RuS$ : C, 50.8; H, 4.1; N, 7.6. Experimental: C, 50.7; H, 4.2; N, 7.5.

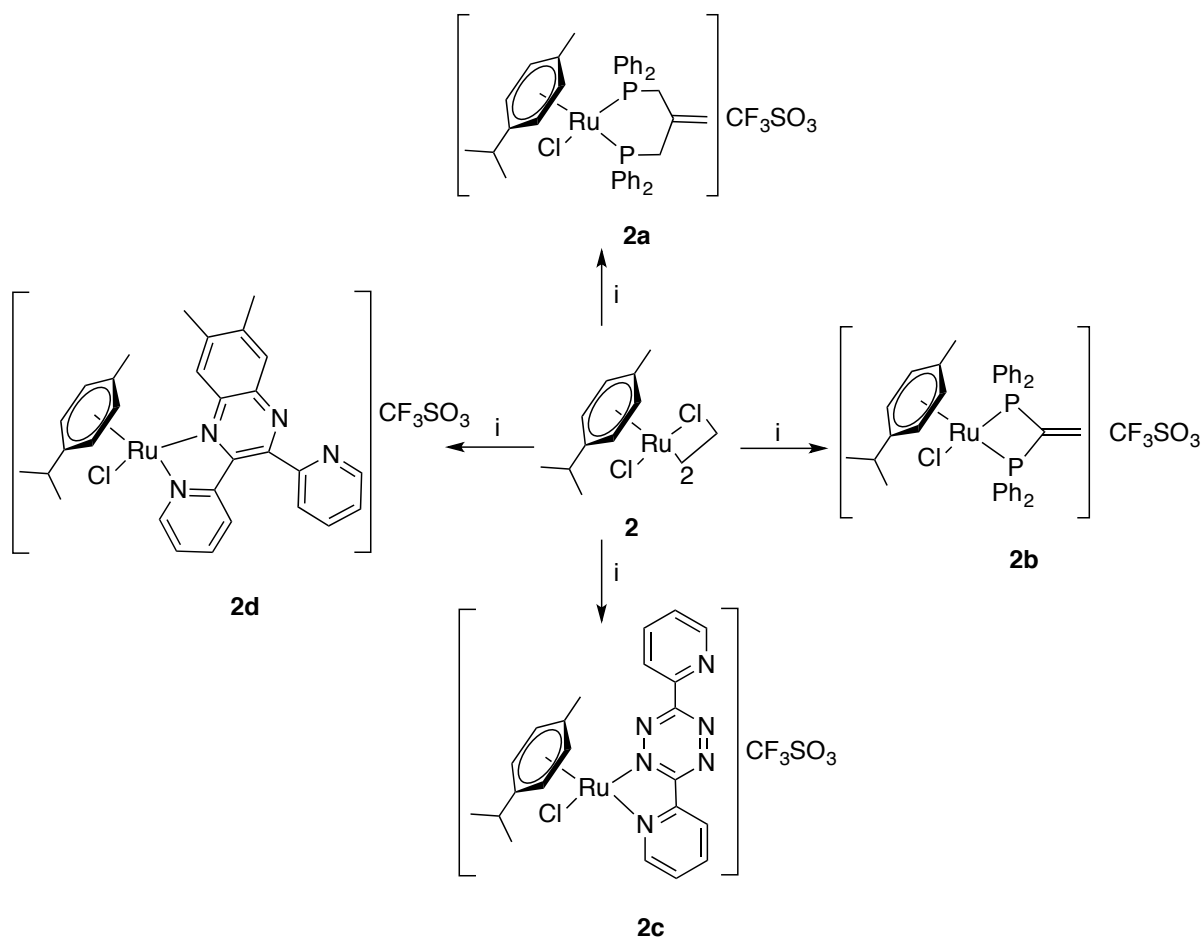
**IR** (cm<sup>-1</sup>, FTIR): (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), 1028f; 1149f; 1222h; 1255f.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, δ ppm, J Hz): 9.54 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=5.6]; 8.71 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=4.4]; 8.67 [s, 1H]; 8.33 [m, 2H]; 8.14 [s, 1H]; 8.00 [td, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=7.7, <sup>4</sup>J(HH)=1.4]; 7.76 [m, 2H]; 7.29 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=7.7]; 6.40 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=5.7, H<sub>ar-cimeno</sub>]; 6.24 [d, 1H, <sup>3</sup>J(HH)=5.7, H<sub>ar-cimeno</sub>]; 6.10 [d, 2H, <sup>3</sup>J(HH)=5.2, H<sub>ar-cimeno</sub>]; 2.75 [s, 3H, Me]; 2.68 [s, 3H, Me]; 2.59 [m, 1H, CHMe<sub>2</sub>]; 2.40 [s, 3H, Me]; 1.18 [d, 3H, <sup>3</sup>J(HH)=6.9, CHMe]; 1.08 [d, 3H, <sup>3</sup>J(HH)=6.9, CHMe].

**MS-FAB:** m/z = 598.0 [Ru(p-Cy)<sub>2</sub>(C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>)Cl]<sup>+</sup>.

**Conductividad molar específica:** Λ<sub>m</sub> = 132.2 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> (en acetona).

## Esquema de los compuestos mononucleares de rutenio derivados de paracimeno.

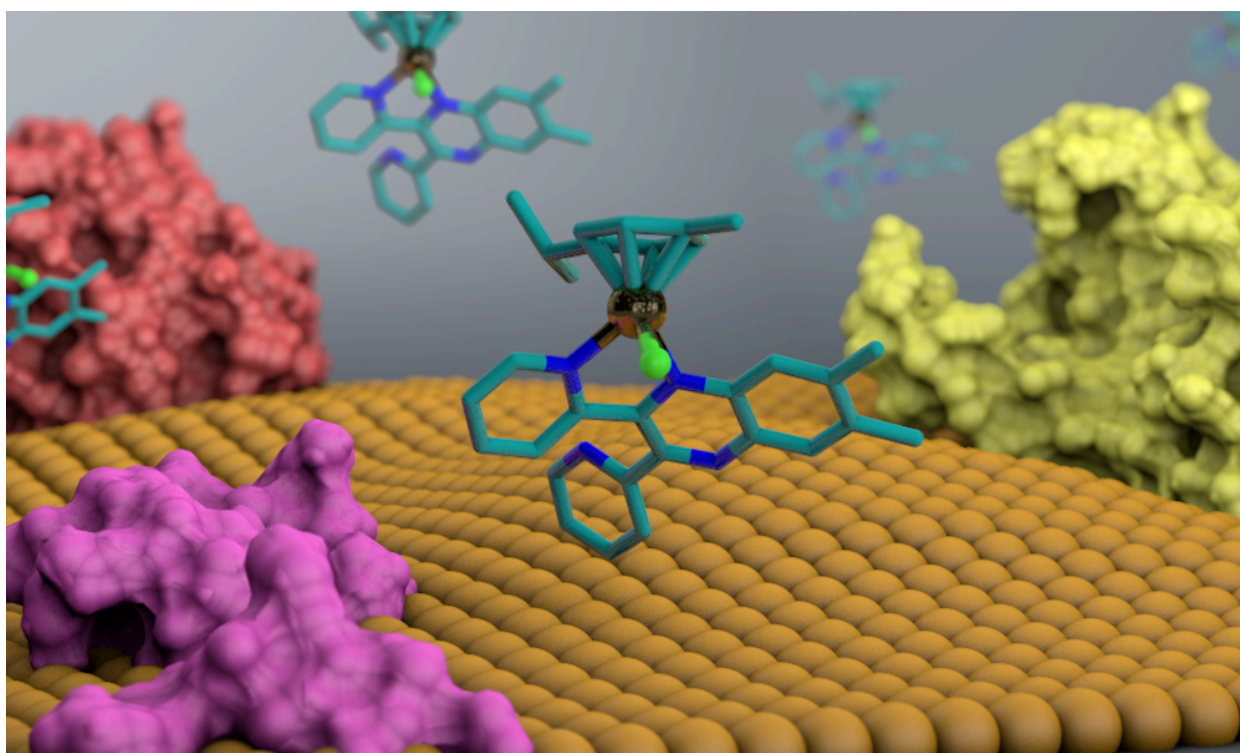


**Esquema 4:** i)  $\text{AgCF}_3\text{SO}_3$  (diclorometano)

2)  $\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$  (2a),  $\text{Ph}_2\text{PC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$  (2b),  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_6$  (2c),  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4$  (2d)

---

## 4. Discusión de resultados.



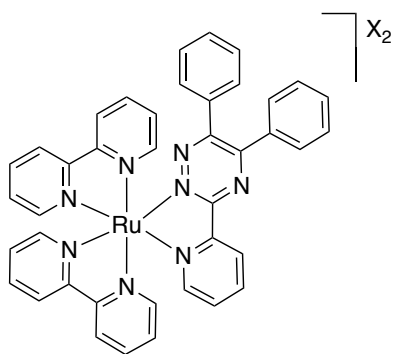
## 4.1 Compuestos mononucleares de rutenio derivados de bipyridina.

### 4.1.1. Determinación estructural.

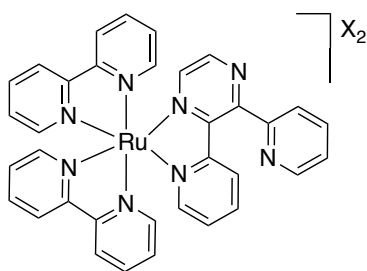
El tratamiento del complejo precursor de rutenio, *cis*-[Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], con trifluorometanosulfonato de plata o hexafluorofosfato de talio da lugar a la formación de una especie intermedia en la cual los ligandos cloro han sido sustituidos por ligandos acetona, *cis*-[Ru(bipy)<sub>2</sub>(OCMe<sub>2</sub>)<sub>2</sub>], y en la que la labilidad de éstos facilita su sustitución en la posterior reacción con los ligandos apropiados en la relación molar correspondiente (ver sección experimental, apartado 3.3.1), conduciendo a la obtención de las especies mononucleares de rutenio **1a-1j**, que se aislaron como sólidos estables con buenos rendimientos (entre 70 y 84%) y para los que se han propuesto las siguientes estructuras.

El análisis elemental de los productos obtenidos es coherente con la formulación presentada, para compuestos mononucleares del tipo [Ru(bipy)<sub>2</sub>(L)][X]<sub>2</sub> (L = ligando bidentado; X = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, PF<sub>6</sub>).

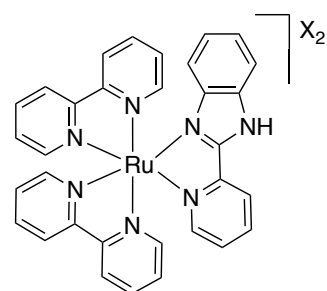
Las medidas de conductividad se realizaron empleando una concentración de 10<sup>-3</sup> M, en acetonitrilo en el caso del complejo **1i** y en etanol para el resto de las especies.



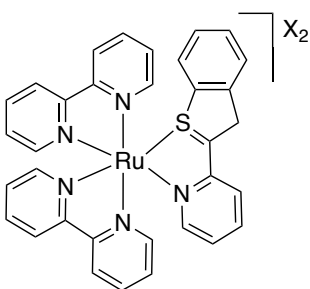
**1a / 1b**



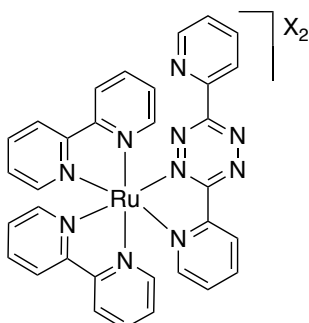
**1c**



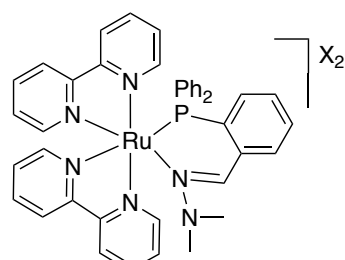
**1d**



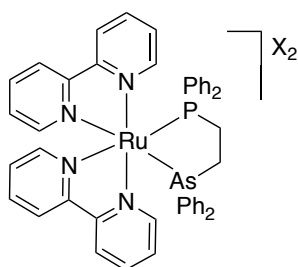
**1e**



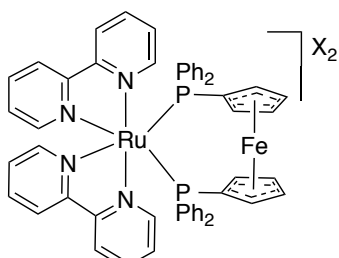
**1f**



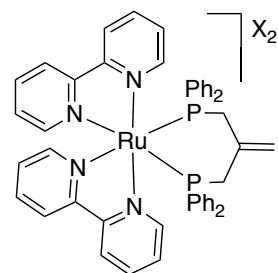
**1g**



**1h**



**1i**



**1j**

**1a:** X= CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>  
**1b:** X= PF<sub>6</sub>

Los resultados indican en todos los casos que se trata de electrolitos 1:2<sup>88</sup>, lo que es coherente con la formulación planteada sobre la base de que dichas especies que están formadas por un catión complejo de Ru(II) y dos contraiones, hexafluorofosfato en el compuesto **1a** o triflato para los demás compuestos.

La estructura mononuclear de los complejos de rutenio se pone también de manifiesto por medio de la espectrometría de masas, que muestra en todos los casos, y con una elevada intensidad, las señales correspondientes al fragmento resultante de la pérdida de los dos contraiones,  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{ligando})]^+$ . Estas señales que contienen al átomo metálico se identifican con facilidad ya que presentan patrones isotópicos que cubren un apreciable intervalo  $m/z$  debido a la presencia de los distintos isótopos del rutenio, que tiene siete isótopos estables, el más abundante,  $^{102}\text{Ru}$ , con una abundancia relativa del 31,6%, y además existen otros cuatro isótopos con una abundancia superior al 10%. La comparación de los patrones isotópicos experimentales, en la relación de posición y de intensidades, con los obtenidos mediante simulación a partir de las fórmulas propuestas, ha permitido corroborar la asignación de los picos y, consecuentemente, la obtención de los productos indicados. En el resto de los compuestos también pueden identificarse en los espectros de masas, a excepción del derivado **1e**, las señales del fragmento correspondiente a la pérdida de un único contraión,  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{ligando})(\text{X})]^+$  ( $\text{X} = \text{PF}_6$ , **1a**;  $\text{X} = \text{CF}_3\text{SO}_3$ , **1b-1d**, **1f-1j**).

---

<sup>88</sup> W. Geary. *Coord. Chem. Rev.* **1971**, 7, 81.

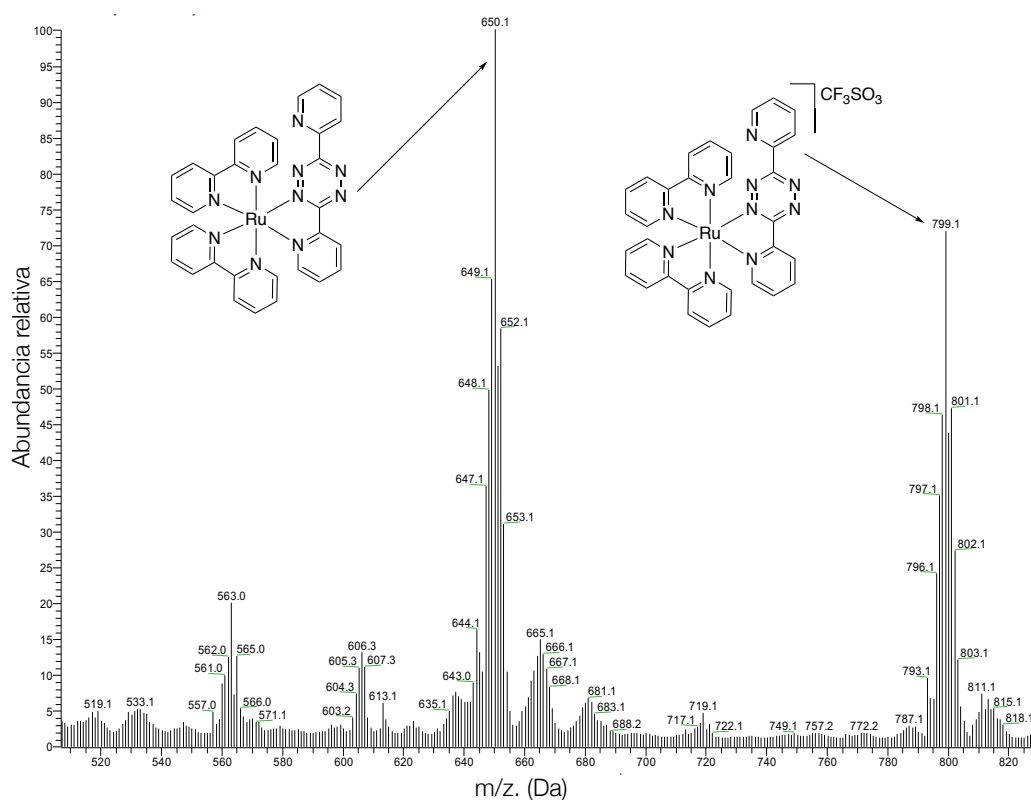


Figura 30. Espectro de masas del compuesto **1f**.

La espectroscopia infrarroja ha permitido una evaluación cualitativa de la presencia de determinados grupos funcionales en la estructura de los compuestos, debido a la detección de la presencia de las bandas correspondientes. De esta forma, en los espectros de todos los complejos se pueden observar las bandas de vibración características de los ligandos bipyridina (en algunos casos, solapadas con otras bandas de la misma naturaleza procedentes del coligando presente).

Cerca de  $3000\text{ cm}^{-1}$  se registra la vibración de los enlaces C-H aromáticos<sup>89</sup> y en el intervalo  $1600\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$  se aprecian las señales que corresponden a las vibraciones de tensión de los enlaces C=C y C=N del anillo de bipyridina. En torno a  $750\text{ cm}^{-1}$ , además, se registra para el enlace C-H la banda correspondiente a la deformación fuera del plano.

<sup>89</sup> A. O. Adeloye. *Molecules*. **2011**, 16, 8354.

Por otra parte, si bien la identificación de las bandas de vibración de los ligandos triflato no coordinados resulta un poco compleja debido a que los modos de vibración del grupo  $\text{CF}_3$  en ocasiones se superponen a los del  $\text{SO}_3$ , en los espectros IR de los compuestos **1b-1j** se han podido asignar cuatro bandas intensas, entre  $1270$  y  $1030\text{ cm}^{-1}$ , a las vibraciones  $\nu_{\text{asim}}(\text{SO}_3)$ ,  $\nu_{\text{sim}}(\text{SO}_3)$ ,  $\nu_{\text{asim}}(\text{CF}_3)$  y  $\nu_{\text{sim}}(\text{CF}_3)$ , lo cual corrobora la presencia del triflato como contraión<sup>90</sup>. En el caso particular del compuesto **1a**, se ha identificado una banda a  $804\text{ cm}^{-1}$  asignada a la la vibración  $\nu[\text{PF}_6(\text{A1})]$ <sup>91</sup>, lo que corrobora la presencia de hexafluorofosfato como contraión<sup>92</sup>.

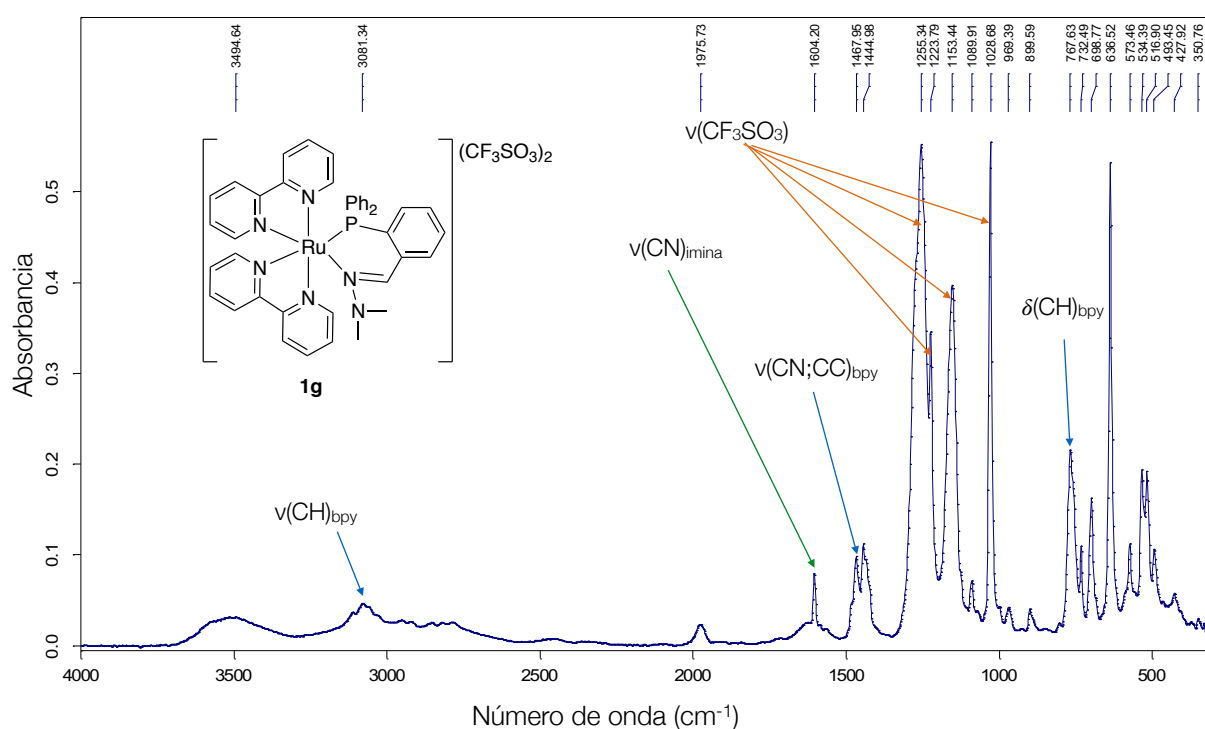


Figura 31. Espectro de IR del compuesto **1g**.

<sup>90</sup> A) D. H. Johnston, D. F. Shriver, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 1045. B) M.G. O'Toole, B. Bennet, M.S. Mashuta, C. A. Grapperhaus. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 2300. C) W. Harhour, C. Mchiri, S. Najmudin, C. Bonifácio, H. Nasri. *Acta Cryst.* **2016**, E72, 720. D) P. Paul, M. Ghosh, D. Neogy, P.K. Mallick. *Spectrochimica Acta Part. A.* **2011**, 78, 59.

<sup>91</sup> A) C.M. Kepert, G.B. Deacon, N. Sahely, L. Spiccia, G.D. Fallon, B.W. Skelton, A.H. White. *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 2818. B) K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Sixth Edition **2009**, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken (New Jersey).

<sup>92</sup> A.M.F. Benial, V. Ramakrishnan, R. Murugesan. *Spectrochimica. Acta Part. A.* **2002**, 58, 1703.



Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de todos los derivados resultan ser complejos debido a que en sus estructuras está presente un gran número de átomos de hidrógeno con entornos químicos muy parecidos, por lo que en una pequeña zona se pueden apreciar muchas señales y con un alto grado de solapamiento. De esta forma, en el caso de los complejos **1a-1f** los coligandos quelato presentan anillos adicionales al fragmento  $\text{Ru}(\text{bipy})_2$  de piridina, otros anillos heterocíclicos o anillos fenílicos cuyas señales de resonancia en RMN de  $^1\text{H}$  se solapan con las señales procedentes del fragmento  $\text{Ru}(\text{bipy})_2$ . En el caso de los complejos **1g-1j** los coligandos quelato presentan dos o cuatro anillos fenílicos (procedentes de los grupos  $\text{PPh}_2$  y, en el caso del compuesto **1h**, del grupo  $\text{AsPh}_2$ ) que aportan a la estructura global un gran número de átomos de hidrógeno cuya resonancia ocluye la de otros protones de la molécula. Sin embargo, si se comparan los espectros de cada complejo obtenido con el espectro del compuesto precursor, *cis*- $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$  y del ligando quelato que se coordina, se puede observar, por una parte, que no se registran las señales asignadas al precursor o al ligando adicionado libre y, por otra parte, que se han producido variaciones en las posiciones de las señales de resonancia. Además, la integración de las señales coincide en todas las especies con el número de protones esperado para cada compuesto.

En la siguiente figura se muestra la superposición de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto *cis*- $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ , el ligando tetrazina libre y el compuesto **1f**, observando que en este último no coincide ninguna señal de resonancia con las señales de los precursores de partida.

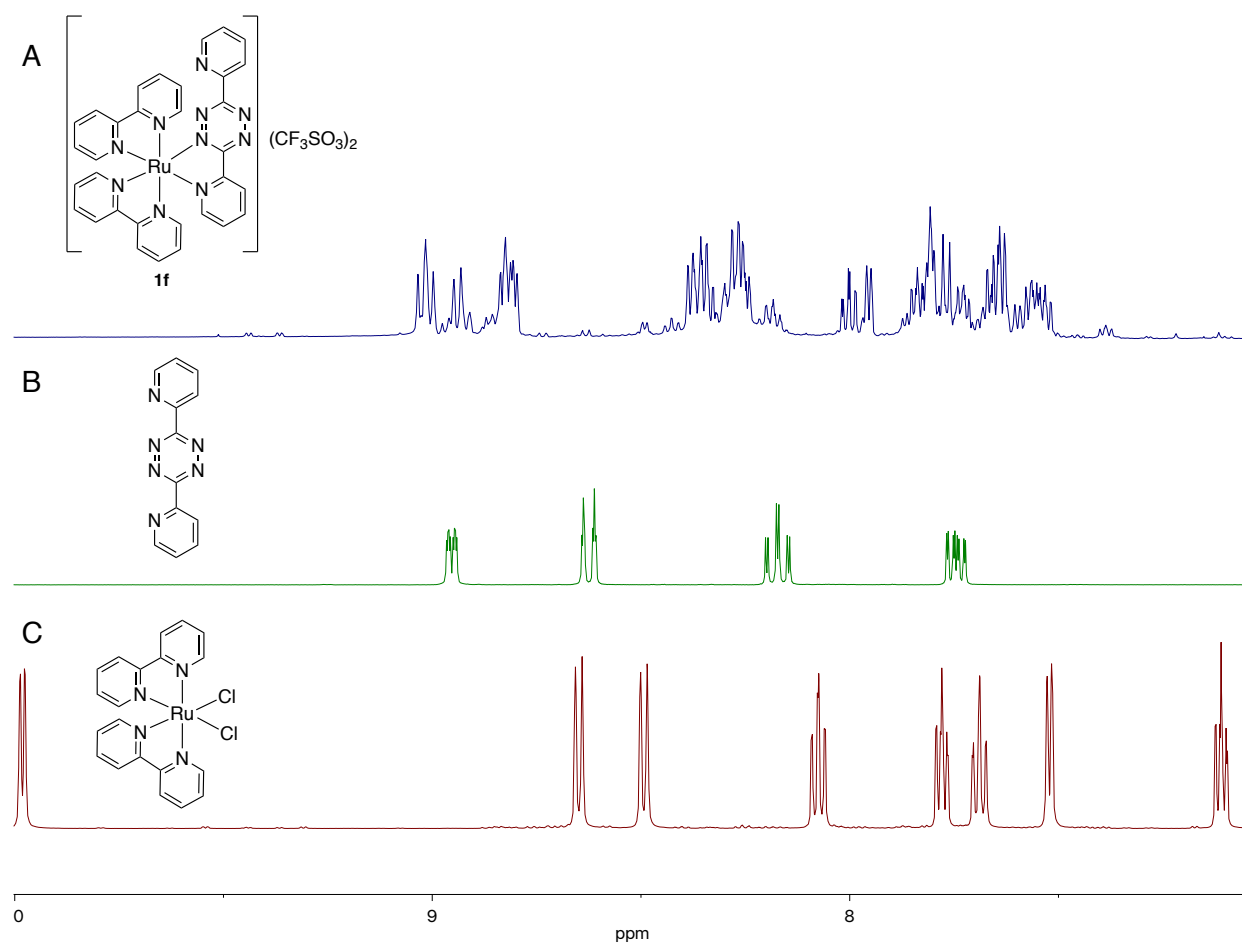


Figura 32. Superposición de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  del complejo **1f** (A), el ligando 5,6-difenil-3-(piridin-2-il)-1,2,4-tetrazina (B), y del complejo *cis*-[Ru(bipy) $_2$ Cl $_2$ ] (C).

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  permiten asignar inequívocamente señales de resonancia de los coligandos que aparecen fuera de la región aromática. Por ejemplo, en el espectro del compuesto **1g**, la señal del protón imínico aparece como un singlete a campo bajo a 9.23 ppm y la señal del grupo NMe $_2$  aparece también como un singlete, a campo alto a 2.09 ppm, mientras que en el espectro del compuesto **1j** un singlete a 4.00 ppm se asigna al grupo C=CH $_2$ . En el caso del compuesto **1i**, (figura 33) en su espectro se identifican claramente cuatro señales de resonancia, entre 4.39 y 5.32 ppm, asignadas a los protones de los anillos del ferroceno, características de un espectro de segundo orden de un sistema AA'XX'<sup>93</sup>.

<sup>93</sup> A) L. Pazderski, T. Pawlak, J. Sitkowski, L. Kozerski, E. Szlyk. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, 48, 450. B) D.A. Freedman, J.K. Evju, M.K. Pomije, K.R. Mann. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 5711.

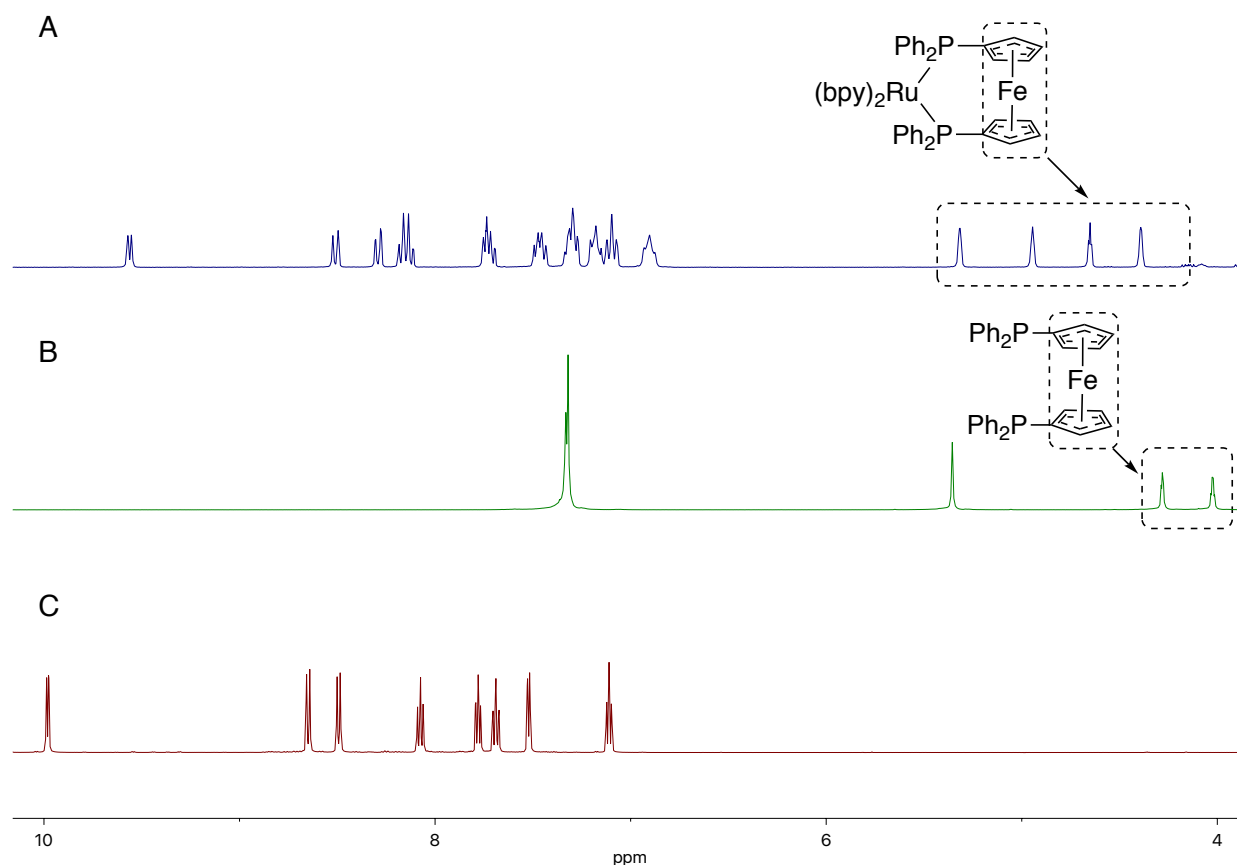


Figura 33. Superposición de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  del complejo **1i** (A), el ligando 1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno (B), y el complejo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$  (C).

Los espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  (ver tabla 1) de los complejos **1g-1j** presentan un único singlete, entre 21.0 y 65.0 ppm, desplazado a campo bajo con respecto a la señal de la correspondiente fosfina libre, de acuerdo con la coordinación de los átomos de fósforo al centro metálico.

En el caso particular de los complejos **1i** y **1j**, la presencia de una única señal singlete indica que ambos átomos de fósforo de la difosfina son equivalentes.

Compuesto	$\delta(\text{P})$ (ppm)	$\delta(\text{P})_{\text{Fosfina libre}}$ (ppm)
1g	52.2	-12.2
1h	65.5	-11.9
1i	33.0	-16.5
1j	21.7	-17.2

Tabla 1. Datos de espectroscopia de RMN  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  para los compuestos **1g-1j**.

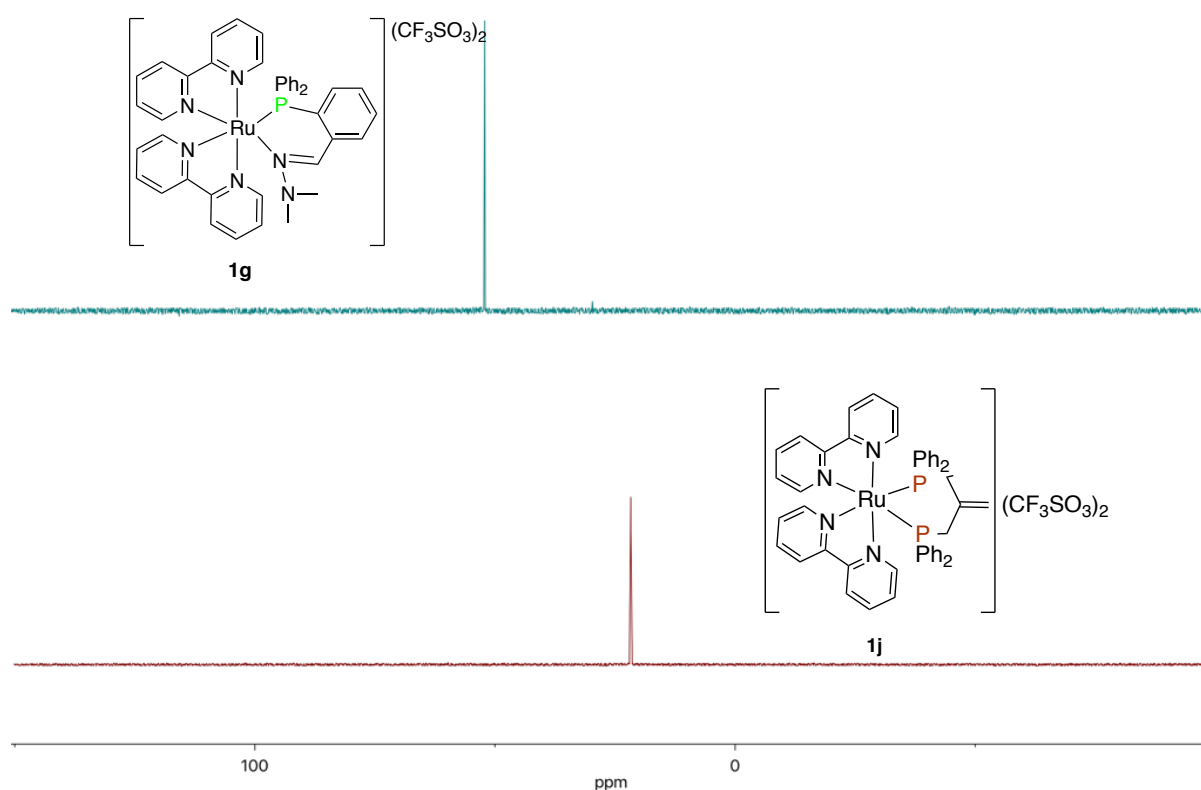


Figura 34. Espectros de RMN  $^{31}\text{P}$ - $\{^1\text{H}\}$  de los compuestos **1g** y **1j**.

La resolución por difracción de RX de la estructura cristalina de los compuestos **1b**, **1c**, **1e**, **1g**, **1h** y **1j** confirma la estructura propuesta a partir de los datos espectroscópicos. Los monocristales adecuados para ello han sido obtenidos mediante difusión líquida de *n*-hexano sobre una disolución de diclorometano del complejo correspondiente excepto para el caso del compuesto **1i** que se obtuvieron mediante evaporación lenta de una disolución de etanol. Los datos cristalográficos significativos se indican en la Tabla 16, 17, 18, y 19 del Anexo I y una selección de distancias y ángulos de unión en la Tabla 23 y 24 del Anexo II.

La unidad asimétrica de los compuestos **1b**, **1c**, **1e**, **1g**, **1h** y **1j** contiene una molécula del catión complejo mononuclear y dos contraiones de trifluorometanosulfonato. En el caso del complejo **1i** la unidad asimétrica contiene dos cationes moleculares y cuatro aniones de trifluorometanosulfonato. En este último

crystal los parámetros geométricos de ambos cationes son similares y, en consecuencia, sólo se describe uno de ellos. Además, salvo para el compuesto **1e**, todas las unidades asimétricas contienen moléculas de algún disolvente utilizado en el proceso de síntesis y aislamiento de los productos: tres moléculas de diclorometano en **1b**, dos en **1c**, una molécula de agua en **1g**, media en **1h**, una molécula de etanol en **1i** y dos moléculas diclorometano en **1j**.

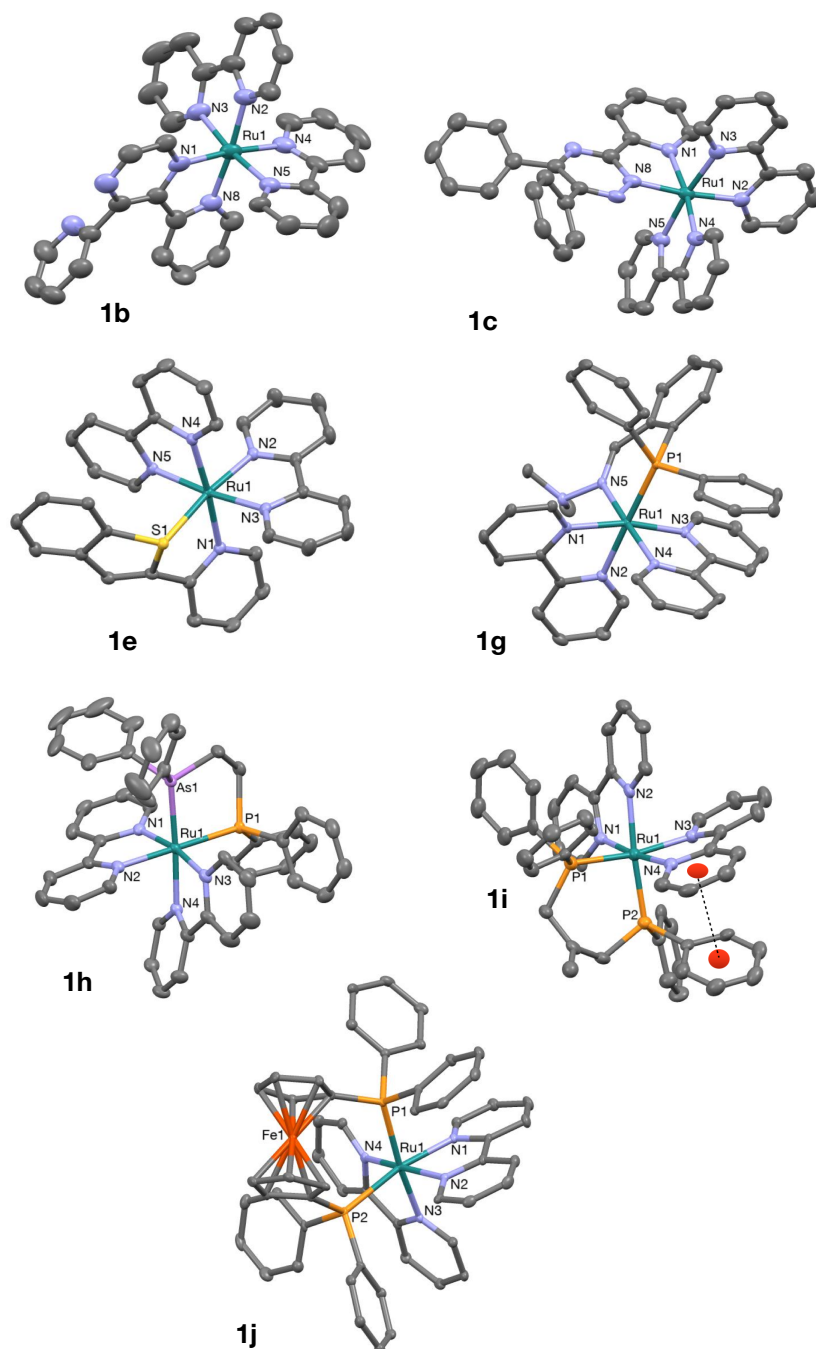


Figura 35. Estructura cristalina del catión molecular de los compuestos **1b**, **1c**, **1e**, **1g**, **1h**, **1i**, y **1j**.

En todos los cationes complejos que se discuten en el epígrafe, el átomo de rutenio(II) se encuentra enlazado a tres ligandos quelatantes, con una geometría octaédrica distorsionada. Dos de estos ligandos son moléculas de 2,2'-bipiridina, mientras que el tercer ligando es 5,6-difenil-3-(piridin-2-il)-1,2,4-tetrazina en el complejo **1b**, 2,3-di(piridin-2-il)pirazina en **1c**, 2-(benzotiofen-2-il)piridina en **1e**, 2-(2-(2-difenilfosfino)fenil)etiliden)-1,1-dimetilhidrazina en **1g**, (2-(difenilarsinil)etil)difenilfosfina en **1h**, 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno en **1i** y (2-metilenopropano-1,3-diil)bis(difenilfosfina) en **1j**.

Dada la geometría octaédrica de los complejos, los tres ligandos quelatantes se pueden disponer en torno al átomo de rutenio según dos configuraciones,  $\Delta$  y  $\Lambda$ . Los complejos **1b**, **1c**, **1e**, **1g**, **1h** y **1j** cristalizan en grupos espaciales centrosimétricos, por lo que en el cristal están presentes ambos enantiómeros; Sin embargo el compuesto **1i** cristaliza en el grupo  $P2_1$  lo que indica que en el cristal sólo puede estar presente uno de los isómeros, en este caso el de configuración  $\Delta$ .

Los fragmentos  $Ru(bipy)_2$  presentan una geometría muy similar en todos los complejos, con distancias Ru-N en el intervalo 2.044-2.126 Å correspondiente a los enlaces Ru(1)-N(2) en **1e** y Ru(1)-N(3) en **1g**, respectivamente. Las distancias más largas corresponden sistemáticamente a los enlaces Ru-N en posición *trans* a los átomos de fósforo o arsénico, poniendo de manifiesto la mayor influencia *trans* de dichos átomos. Llama la atención que en el compuesto **1i**, que contiene la difosfina ferroceno como tercer ligando quelatante, las cuatro distancias de enlace Ru-N sean prácticamente idénticas, independientemente de si el átomo en *trans* es nitrógeno o fósforo; la causa podría estar en el mayor impedimento estérico causado por dicho ligando.

Los ligandos bipiridina son en gran parte responsables de la distorsión de la geometría de coordinación octaédrica, ya que imponen ángulos de enlace N-Ru-N en el intervalo 77.7-79.1° para los enlaces N(4)-Ru(1)-N(5) en **1b** y N(1)-Ru(1)-N(2) en **1i**,

respectivamente, debido a su naturaleza quelatante. Dicho ángulos están alejados del valor ideal de  $90^\circ$  esperado para un octaedro regular.

Los ligandos bipyridina son prácticamente planos y coplanarios con el quelato de cinco miembros que forman con el átomo de rutenio, aunque presentan ligeras distorsiones por razones probablemente estéricas.

En los complejos **1b** y **1c**, los ligandos derivados de triazina y pirazina actúan como bidentados quelatos a través de los nitrógenos N(1) y N(8), formando un anillo de cinco miembros. Los anillos heterocíclicos enlazados al metal adoptan una disposición coplanar entre sí y con el anillo quelato de coordinación, aunque con pequeñas distorsiones. Las distancias de enlace Ru-N son muy similares a las anteriormente mencionadas para las uniones Ru-bipy y características de un enlace fundamentalmente sencillo. Igualmente las restricciones geométricas impuestas por el ligando cierran el ángulo de enlace N(1)-Ru(1)-N(8) hasta los  $79.03$  y  $78.00^\circ$ , para **1b** y **1c**, respectivamente, valores menores al ideal para una geometría octaédrica.

En el caso del complejo **1e**, el ligando benzotiofenpiridina también actúa como bidentado quelato a través del nitrógeno N(1) y del azufre S(1), formando un anillo de cinco miembros, pero, a diferencia de los anteriormente descritos, no es plano. La distancia de enlace Ru(1)-N(1)  $2.120 \text{ \AA}$  es algo mayor a las descritas anteriormente indicado un enlace algo más débil; la distancia Ru(1)-S(1)  $2.349 \text{ \AA}$  es similar a la descrita en el único ejemplo de un ligando similar enlazado a Ru(II) encontrado en la bibliografía<sup>94</sup>.

En el caso del complejo **1g**, el ligando fosfinohidrazina se encuentra enlazado al centro de Ru(II) a través del átomo de fósforo P(1) y del nitrógeno N(1), formando un quelato de seis miembros con menos tensión que los anteriormente descritos, como demuestra el ángulo de enlace P(1)-Ru(1)-N(5) de  $88.20^\circ$  grados.

---

<sup>94</sup> E.C. Constable, R.P.G. Henney, D.A. Tocher. *Chem. Commun.* **1989**, 913.

En los cationes complejos **1h**, **1i** y **1j**, los ligandos fosfinoarsina o difosfina también actúan como quelatos, enlazados a través de ambos átomos de fósforo o de arsénico (**1h** y **1i**) y fósforo (**1h**), formando anillos de cinco (**1h**) o seis miembros (**1i** y **1j**). En estos ejemplos los ángulos de enlace formados por los ligandos y rutenio oscilan entre los 83.6° del enlace P(1)-Ru(1)-As(1) de **1h** y los 99.80° del P(1)-Ru(1)-P(2) en el complejo **1i**, como corresponde al mayor tamaño del quelato en este último.

Las distancias de enlace P(1)-Ru(1) se encuentran en el margen de 2.336-2.424 Å encontrados en los complejos **1h** y **1i**, respectivamente. Como se puede ver la distancia fósforo-rutenio es perceptiblemente mayor en el complejo con la fosfinaferroceno, lo que concuerda con los datos encontrados en bibliografía. La distancia Ru(1)-As(1) de 2.363 Å concuerda también con los valores encontrados en los escasos ejemplos de compuestos de este tipo de ligandos coordinados al rutenio<sup>95</sup>.

En el compuesto **1j** además se aprecian interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre uno de los anillos fenilo de fosfina y un anillo de piridina de uno de los ligandos bipyridina que parece estabilizar la conformación del ligando fosfina en el complejo (ver figura 35).

Para los compuestos **1a-1e** se empleó la voltametría cíclica para su caracterización electroquímica, puesto que el potencial redox del centro de rutenio puede constituir un parámetro importante para determinar las actividades fisiológicas de estos derivados. Las medidas se llevaron a cabo en diclorometano y acetonitrilo, y los datos más relevantes se presentan en las Tablas 28 y 29 del Anexo III.

Los complejos de rutenio mostraron tanto procesos centrados en el metal (rango de potencial positivo) como varios procesos centrados en los ligandos (rango de potencial negativo). Todos los procesos de oxidación están relacionados con la oxidación en el metal ya que las ondas reductivas observadas se atribuyeron a procesos de reducción de ligandos.

<sup>95</sup> A.A. La Pensee, J. Bickley, S.J. Higgins, M. Marcaccio, F. Paolucci, S. Roffia, J.M. Charnock. *Dalton Trans.* **2002**, 4095.



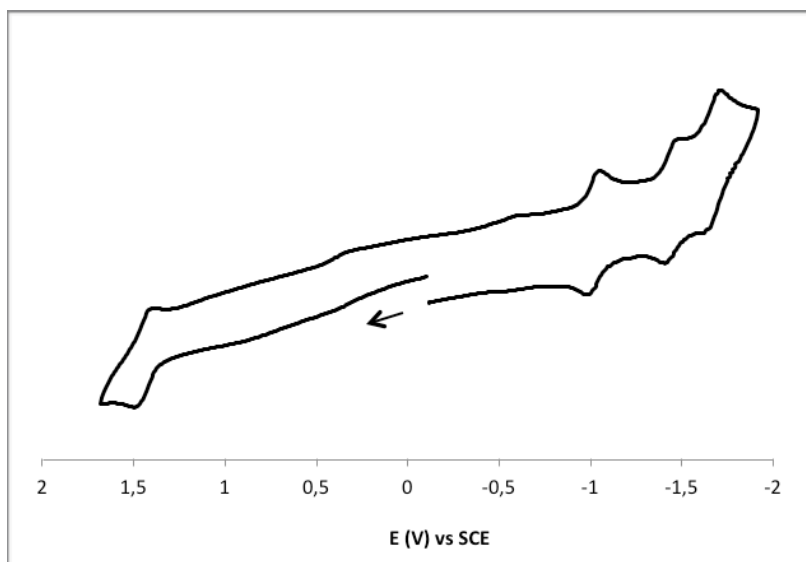


Figura 36. Voltamograma del compuesto **1c**.

Por ejemplo, el voltamograma cíclico del complejo **1c** en acetonitrilo (figura 36) muestra un proceso de oxidación cuasi-reversible a  $E_{1/2} = 1,44$  V que se atribuyó al proceso redox Ru(II)/Ru(III). Los tres procesos de reducción registrados corresponden con procesos centrados en los ligandos a -1,01 V, -1,44 V y -1,67 V.

En diclorometano, los procesos de Ru(II)/Ru(III) se observan en el rango de 1,52-1,67 V, siendo este último el potencial más alto registrado correspondiente para el complejo **1c**. Sin embargo para este complejo la oxidación del metal está acompañada de una adsorción en el electrodo.

En acetonitrilo se observó que los potenciales de oxidación del metal se registraron dentro del rango 1,28-1,44 V y son similares a los observados para otros complejos de rutenio derivados de bipyridina<sup>96</sup>.

Los complejos muestran electroquímica reversible por regla general y aunque los potenciales redox para Ru(II)/Ru(III) no dependen notablemente de la naturaleza del sustituyente NN, el complejo **1c** es más difícil de oxidar que los otros derivados.

<sup>96</sup> D.P. Rillema, G. Allen, T.J. Meyer, D. Conrad. *Inorg. Chem.*, **1983**, 22,1617.

Cabe destacar que en acetonitrilo cuanto más fácil resulta oxidar el compuesto, más activo resulta ya que los datos de citotoxicidad (que se presentarán en la siguiente sección) indican que el orden de actividad es el siguiente: **1d** > **1b** > **1a** > **1c**.

Compuesto	E <sub>pa</sub> (V) (Acetonitrilo)
1a	1.45
1b	1.44
1c	1.49
1d	1.32

*Tabla 2. Datos de potencial en acetonitrilo para los compuestos 1a-1d.*

En cuanto a los complejos **1a** y **1b**, la influencia del contraión no es significativa para el comportamiento electroquímico en los disolventes estudiados.

### 4.1.2. Estudios antiproliferativos *in vitro* en líneas de cáncer humano.

Los estudios de citotoxicidad se realizaron mediante el método MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, dando lugar a un compuesto de color azul (formazán). Así, la capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la supervivencia celular.

Esta supervivencia celular se puede emplear como medida de la concentración de inhibición media ( $IC_{50}$ ) de un compuesto para inhibir la función biológica o bioquímica. Esta medida cuantitativa indica la cantidad de un medicamento en particular o de otra sustancia, que es necesaria para inhibir un proceso biológico dado (o componente de un proceso, es decir, una enzima celular, receptor de la célula o microorganismo) a la mitad. En el presente trabajo el valor de  $IC_{50}$  se corresponde con la concentración de complejo necesaria para obtener el 50% de muerte celular. Para todos los compuestos se empleó como referente de actividad la línea celular de cáncer de ovario A2780 por su alta sensibilidad al *cis*-platino.

Para los compuestos **1a-1e** también se han realizado estudios de citotoxicidad sobre las líneas MCF7 (de cáncer de mama), y HT29 (de cáncer de colon), y sobre las líneas PC3 (de cáncer de próstata, compuesto **1e**) y sobre V79 (células sanas de hámster, compuesto **1b** y **1e**). Los valores obtenidos se indican en la Tabla siguiente.

Compuesto	IC <sub>50</sub> $\mu$ M				
	A2780	MCF7	HT29	PC3	V79
<i>cis</i> -[Ru(bipy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	> 100	> 100	> 100		
1a	156 $\pm$ 22	73 $\pm$ 15	> 100		
1b	46 $\pm$ 7.5	56 $\pm$ 8.5	> 100		> 100
1c	141 $\pm$ 50				
1d	78.4 $\pm$ 34	107 $\pm$ 34	> 100		
1e	4.0 $\pm$ 2.1	5.9 $\pm$ 1.1	27 $\pm$ 6.0	9.2 $\pm$ 1.7	22 $\pm$ 6.2
<i>cis</i> -platino	2.1 $\pm$ 0.1	23.9 $\pm$ 0.5			

Tabla 3. Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos **1a-1e** en las líneas A2780, MCF7, HT29, PC3 y V79.

Un primer resultado a analizar es la comparación entre la actividad citotóxica de los compuestos **1a** y **1b**. Aunque ambos tienen el mismo catión molecular poseen contraiones diferentes (PF<sub>6</sub> y CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> respectivamente). Con esta simple variación se han obtenido resultados de actividad distintas, mostrándose más activo el compuesto **1b** frente a las líneas A2780 y MCF7.

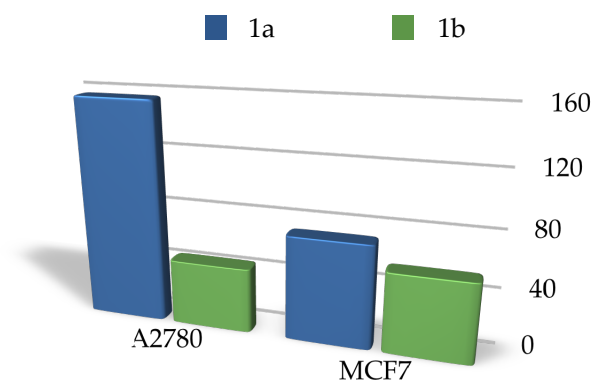


Figura 37. Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos **1a** y **1b** en las líneas A2780 y MCF7.

Este hecho constata la implicación del contraión en la actividad citotóxica, por un lado, y por otro da información acerca del procedimiento sintético a seguir. De esta forma los demás compuestos de la serie y los compuestos de las siguientes series se sintetizaron empleando como contraión el anión CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>.

Por otra parte tanto el precursor como los ligandos libres empleados no presentan actividad, por lo tanto, la coordinación de los ligandos al átomo de rutenio

modifica por completo las propiedades de los productos, que son activos desde el punto de vista de la citotoxicidad.

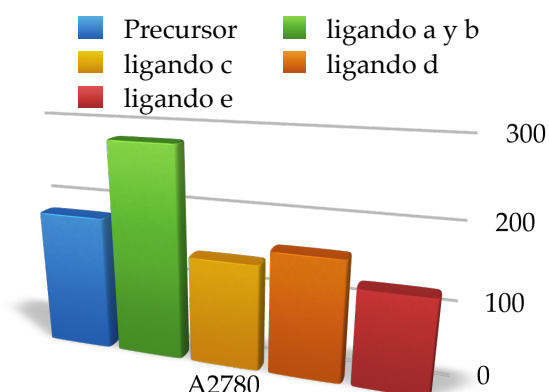


Figura 38. Valores de IC<sub>50</sub> del precursor y los ligandos **a-d** en la línea A2780.

El estudio de la actividad en la línea de cáncer colateral (HT29) muestra que el compuesto **1e** es el más activo. Esta especie resulta ser uno de los compuestos más prometedores de la serie, pues mantiene la actividad en la línea PC3 de cáncer de próstata. El otro compuesto prometedor de la serie es el compuesto **1b**, debido a que en la línea no tumorigénica V79 no presentó actividad citotóxica<sup>97</sup>.

El estudio de la toxicidad de los compuestos **1f-1j** se llevo a cabo en las líneas A2780, MCF7, A529 (leucemia mieloide), HTC116 (carcinoma colorrectal) y fibroblastos (células no tumorigénicas) y los resultados se muestran a continuación.

<sup>97</sup> A) O. Rojas, F. Santos, M. J. Brito, F. Marques, M. P. Robalo, R. Almeida, M. H. García, A. I. Tomaz. 11 International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC 11, P111, Barcelona, Spain, 2011. B) O. Rojas, F. Santos, M. J. Brito, F. Marques, M. P. Robalo, R. Almeida, M. H. García A. I. Tomaz. 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, (4ECCLS), P126, Budapest, Hungary, 2011. C) "Complexos de iões metálicos com interesse na terapia do cancro: estudos de interação com biomoléculas" Filipa Pedro Costa Santos, MSc. Thesis in Química Inorgânica Biomédica- Aplicações em Diagnóstico e Terapia, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2011. D) F. Santos, O. I. Rojas, F. Santos, R. Almeida, M.H. García, A. I. Tomaz. XXV international conference on Organometallics Chemistry (ICOMC 2012), PA 202, Lisbon, Portugal, 2012.

Compuesto	IC <sub>50</sub> $\mu$ M					
	A2780	MCF7	A529	Fibroblastos	K562	HCT116
<i>cis</i> -[Ru(bipy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	180 $\pm$ 20	233 $\pm$ 64	> 100	> 100	> 100	
1f	18 $\pm$ 5.5	25.4 $\pm$ 9.0	> 100	> 100	> 100	> 100
1g	24 $\pm$ 7.5	30 $\pm$ 4.9	> 100	> 100	> 100	68 $\pm$ 0.2
1h	24 $\pm$ 0.9	26.5 $\pm$ 4.5	> 100	> 100	> 100	44 $\pm$ 0.1
1i	25 $\pm$ 7.0	39 $\pm$ 8.5	> 100	> 100	> 100	70 $\pm$ 0.2
1j	4.7 $\pm$ 2.8	20 $\pm$ 5.0	> 100	> 100	> 100	76 $\pm$ 0.2
<i>cis</i> -platino	2.1 $\pm$ 0.1	23.9 $\pm$ 0.5				

Tabla 4. Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos 1f-1j.

Los compuestos **1f-1j** no son activos frente a las líneas A529 y K562 y tampoco frente a fibroblastos. Sin embargo, todos los complejos de rutenio manifiestan un buen comportamiento frente a las líneas A2780 y MCF7 con valores de IC<sub>50</sub> < 40  $\mu$ M. Los mejores resultados de actividad se presentan con el complejo **1j**, con un valor ligeramente superior al que muestra el *cis*-platino frente a la línea A2780 y menor al que muestra éste frente a la línea MCF7, tal y como se puede apreciar en la siguiente figura.

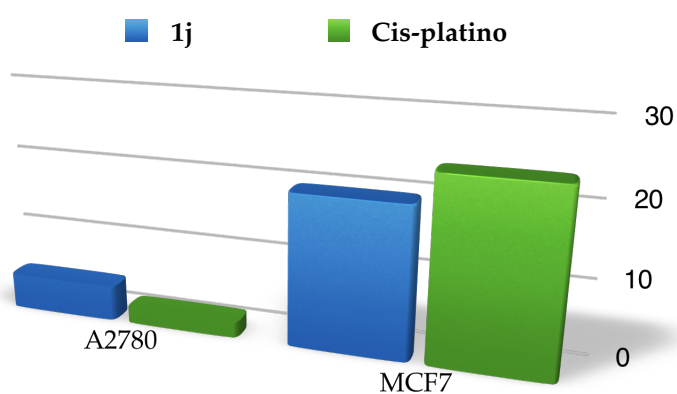


Figura 39. Comparación de la citotoxicidad entre el compuesto **1j** y el *cis*-platino en las líneas A2780 y MCF7.

La línea HTC116 es inmune al compuesto **1f**, y las restantes especies presentan valores relativamente altos de IC<sub>50</sub> en el intervalo 44-76  $\mu$ M.

Cabe destacar que para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer colorrectal predominan los compuestos de naturaleza orgánica y los tratamiento con dichos compuestos, como por ejemplo el fluoracilo o 5FU generan resistencia<sup>98</sup>, por lo que los resultados obtenidos para la línea HTC116 son prometedores, dado que pone de manifiesto la potencialidad del rutenio en el tratamiento de este tipo de cáncer y abre la posibilidad a una mejora en el perfil sintético, a fin de mejorar los resultados de actividad de  $44 \pm 0.1$  obtenido con el compuesto **1g**.

Por otra parte, es importante destacar que la inactividad de los compuestos sobre la línea no tumorigénica de fibroblastos, indican que a priori estas especies actúan selectivamente sobre las células cancerígenas A2780, MCF7 y HTC116.

---

<sup>98</sup> J. Guo, A. Zhou, Y. Fu, U.N. Verma, D. Tripathy, E. Pfrenkel. C.R. Becerra. *Acta Pharmacol. Sin.* **2006**, 27, 1375.





### 4.1.3. Interacción con ADN. Espectrofotometría de ultravioleta visible y de dicroísmo circular.

El ADN o ácido desoxirribonucleico es una molécula de gran importancia biológica en la que se almacena toda la información que gobierna los procesos vitales del organismo y, por esta razón, es una molécula clave en el desarrollo de compuestos anticancerígenos<sup>99</sup> ya que es la molécula diana sobre la que gran parte de los agentes antitumorales desarrollan su acción.

Los fármacos y/o moléculas pequeñas que se unen al ADN lo pueden hacer tanto covalentemente como no covalentemente. La unión covalente en el ADN es irreversible, e invariablemente conduce a la inhibición completa de los procesos en donde se implica el ADN y finalmente a la muerte celular, como es el caso del *cis*-platino. Los fármacos que se unen de forma no covalente se clasifican principalmente en dos clases: intercalantes y con preferencia de unión a los surcos (menor y mayor) del ADN.

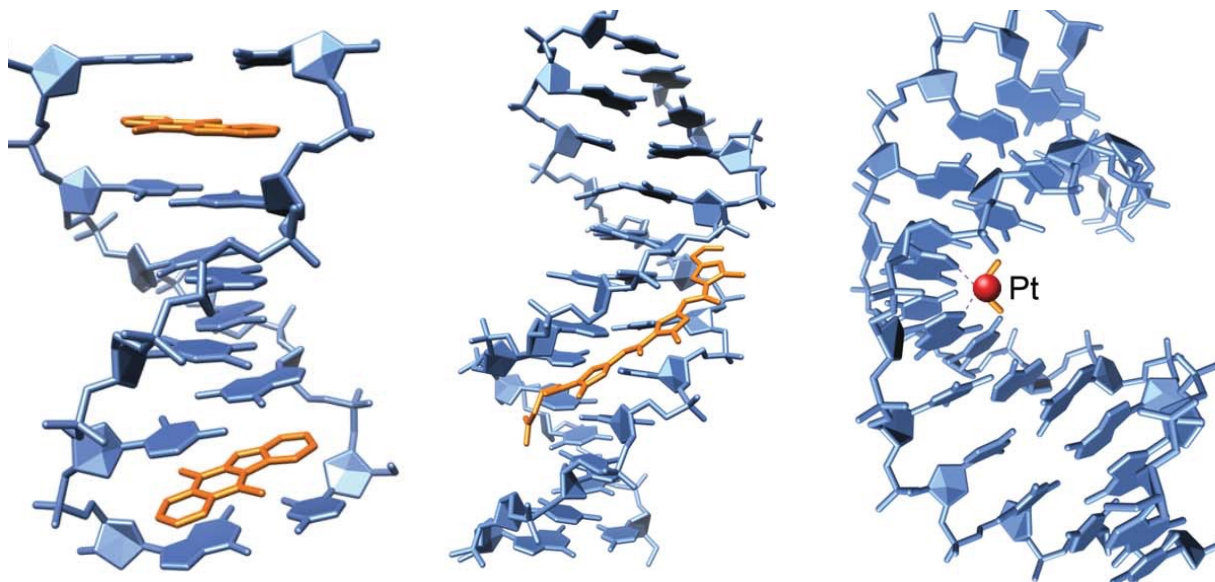


Figura 40. Modos de interacción con el ADN<sup>100</sup>. A la izquierda se representa la intercalación, en el centro la interacción al surco menor de ADN y a la derecha la unión covalente.

<sup>99</sup> A. Ravera, G. Bagni, M. Mascini, D. Osella. *Bioinorg Chem Appl.* **2007**, 1.

<sup>100</sup> D. Roeland Boer, A. Canals, M. Coll. *Dalton Trans.* **2009**, 0, 399.

En el caso del surco mayor éste interacciona sobre todo con proteínas y ciertos oligonucleótidos, en cuanto al surco menor puede llevarse la interacción con fármacos que tengan forma de media luna complementándose con la forma de dicho surco y facilitando su unión. En el caso de los compuestos de coordinación estudiados es posible que dicha unión al surco menor se lleve a cabo sólo a través de una parte de la molécula.

Finalmente los intercaladores se caracterizan por tener grupos heterocíclicos planos que se apilan entre pares de bases de ADN adyacentes. Se cree que el complejo se estabiliza mediante interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre el fármaco y las bases de ADN.

La unión no covalente es reversible y se prefiere típicamente sobre la formación del aducto covalente ya que permite el metabolismo del fármaco, sin embargo la fuerza de la interacción no covalente es menor y representa una desventaja.

Para estudiar qué tipo de interacción se produce entre un compuesto y el ADN, se emplean distintas técnicas como por ejemplo la espectroscopia del ultravioleta visible y el dicroísmo circular.

#### 4.1.3.1. Ultravioleta visible.

La espectroscopia ultravioleta visible es una herramienta ampliamente utilizada en la determinación del modo de interacción entre compuestos metálicos de diversa naturaleza y el ADN<sup>101</sup>. En general, los fenómenos de hipercromismo e hipocromismo observados en los experimentos indican cambios en la estructura del ADN. Además, se suele producir un desplazamiento de las longitudes de onda como consecuencia de la estabilización del ADN<sup>102</sup>. Si dicho desplazamiento se produce hacia longitudes de onda mayores, es decir, un desplazamiento hacia la región roja del espectro, se produce un fenómeno conocido como efecto batocrómico.

Cuando se produce un efecto batocrómico y, además, una disminución en la intensidad de la banda, o hipocromismo, a medida que se incrementan la concentración de ADN, en general se asocia a la unión del compuesto con ADN mediante una interacción de apilamiento entre un grupo planar del compuesto y las bases nitrogenadas del ADN<sup>103</sup>.

Cuando se aprecia un aumento de las intensidades de absorción o hipercromismo, por lo general indica que los complejos se unen o bien mediante interacción electrostática o a través de los surcos mayor y menor del ADN.

Para llevar a cabo el estudio mediante esta técnica, se han escogido los compuestos **1b**, **1e** y **1f-1j** que presentaron los mayores valores de actividad citotóxica dentro de los compuestos de rutenio mononucleares derivados de bipyridina preparados, y la constante de interacción de estos se obtuvo mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

---

<sup>101</sup> E.C. Long, J.K. Barton. *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 271.

<sup>102</sup> E.K. Efthimiadou, A. Karaliota, G. Psomas. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, 104, 455.

<sup>103</sup> M. Sunita, B. Anupama, B. Ushaiah, C. Gyana Kumari. *Ar. J. Chem.* **2017**, 10, S3368.

$$\frac{[ADN]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[ADN]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{k_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

donde  $\epsilon_a$ ,  $\epsilon_b$ ,  $\epsilon_f$  son la absorptividad aparente, la del compuesto unido y la del compuesto libre.

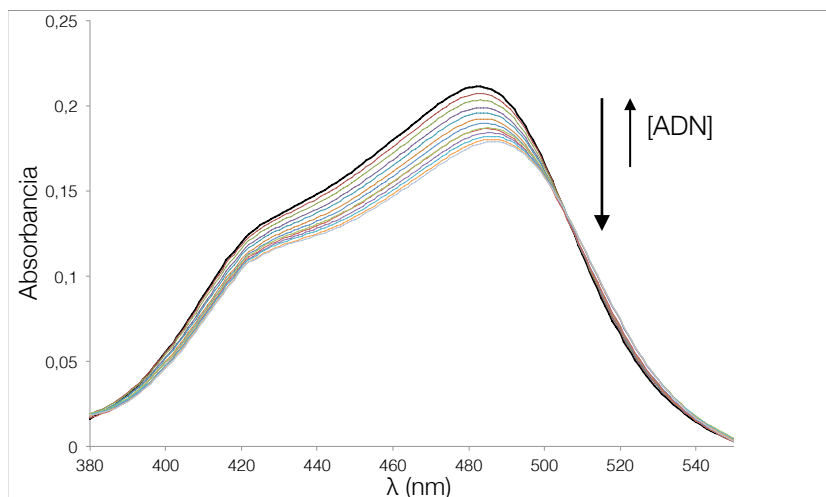


Figura 41. Espectro de absorción de UV-Vis del complejo **1b** 30  $\mu$ M en presencia de concentraciones crecientes de ADN en 10mM Hepes pH 7.4 a temperatura ambiente. En color negro se presenta el espectro del complejo **1b** en ausencia de ADN.

Los compuestos **1b** y **1e** muestran un hiprocromismo consistente, y un efecto batocrómico a medida que se incrementan las concentraciones de *ct*-ADN, por lo que se estima que se unen al ADN mediante intercalación y cuyas constantes de unión son  $2.6 \cdot 10^4 (\pm 0.20)$  y  $3.2 \cdot 10^4 (\pm 0.20)$  respectivamente<sup>97c</sup>.

La intensidad de absorción de los compuestos **1f-1j** aumenta (hipercromismo) con el incremento de la concentración de *ct*-ADN debido al cambio conformacional del ADN (daño de la estructura secundaria del ADN). La interacción con los compuestos de Ru(II) conduce a un cambio no solo en las bandas de mayor energía, situadas en torno a 280 nm (debidas a las transiciones ligando-ligando) sino también en las bandas en torno a los 380 nm (relacionadas con la transferencia de carga metal-ligando). El compuesto **1f** también muestra una banda MLCT amplia en la región visible (430-630 nm) que aumenta cuando lo hace la concentración de *ct*-ADN (figura 42).

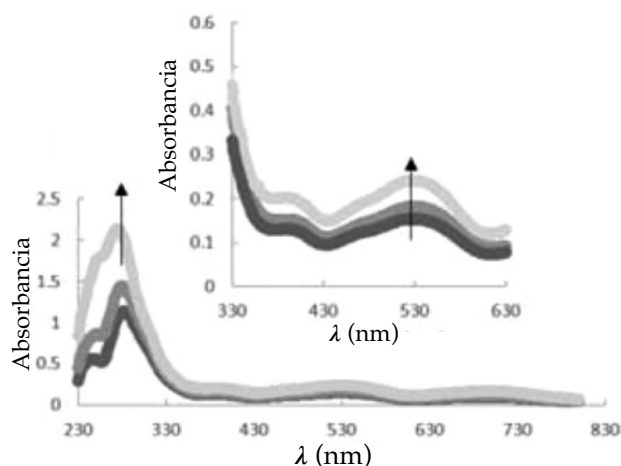


Figura 42. Espectro de absorción de lo compuesto **1f** (20  $\mu\text{M}$ ) en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de *ct*-ADN (0, 5 y 20  $\mu\text{M}$ ). Las flechas indican el aumento en las bandas del espectro (hipercromismo)

El grado de hipercromismo es indicativo de los modos de unión no intercalativos, tales como las fuerzas electrostáticas, la interacción de van der Waals, los enlaces de hidrógeno y la interacción hidrofóbica<sup>104,105</sup>. De hecho, la interacción electrostática entre los cationes cargados positivamente y los grupos fosfatos de la doble hélice del *ct*-ADN puede ser responsable del efecto hipercrómico observado para los complejos **1f-1j** y que también se han observado para otros complejos de rutenio(II).

Cabe destacar que la constante de unión intrínseca  $K_b$  para el compuesto **1f** ( $1.00(\pm 0.20) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) es del mismo orden de magnitud que la que presentan otros complejos metálicos de Ru(II) que se unen al ADN por modos intercalativos<sup>106,107,108</sup> y al menos 10 veces más alta que la que muestran complejos metálicos que también se unen a través de un modo no intercalativo<sup>105,107</sup>.

<sup>104</sup> A) P. Awasthi, N. Kumar, R. Kaushal, M. Kumar, S. Kukreti. *Biochem. Res. Int.* **2015**, 2015, 836928. B) S. Tysoe, R. Morgan. *J. Phys.* **1993**, 2, 1707.

<sup>105</sup> L. Mishra, A. K. Yadaw, R. Sinha, A. K. Singh. *Indian J. Chem.* **2001**, 40A, 913.

<sup>106</sup> A) R. Araya, V. Andino-Pavlovsky, R. Yuste, R. Etchenique. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, 4, 1163. B) G. Carrone, F. Gantov, L. D. Slep, R. Etchenique. *J. Phys. Chem. A* **2014**, 118, 10416. C) S. D. Ramalho, R. Sharma, J. K. White, N. Aggarwal, A. Chalasani, M. Sameni, K. Moin, P. C. Vieira, C. Turro, J. J. Kodanko, B. F. Sloane. *PLoS One* **2015**, 10(11), e0142527. D) G. Carrone, R. Etchenique. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 4363. E) M.K. Herroon, R. Sharma, E. Rajagurubandara, C. Turro, J.J. Kodanko, I. Podgorski. *Biol. Chem.* **2016**, 397, 571.

<sup>107</sup> N. Shahabadi, S. Kashanian, M. Mahdavi, N. Sourinejad. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2011**, 2011, 525794.

Para los restantes compuestos, la constante de interacción  $K_b$  para *ct*-ADN es mucho menor tal y como se puede ver en la siguiente tabla

Compuesto	Constante de unión $K_b$ ( $M^{-1}$ )
1f	$1.00 (\pm 0.20) \times 10^5$
1g	$2.50 (\pm 0.20) \times 10^4$
1h	$1.20 (\pm 0.20) \times 10^4$
1i	$5.71 (\pm 0.20) \times 10^4$
1j	$5.56 (\pm 0.20) \times 10^3$

Tabla 5. Constante de unión entre los compuestos **1f-1j** y el *ct*-ADN.

Además, los valores de  $K_b$  descritos en la literatura para los intercaladores clásicos por ejemplo el bromuro de etidio,  $(7 \times 10^7 M^{-1})^{108}$ , son al menos 10 a 100 veces mayores que los compuestos de Ru(II), reforzando la hipótesis de que la intercalación entre pares de bases no es el modo de interacción de los compuestos con el *ct*-DNA.

<sup>108</sup> M. J. Waring. *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 269.

#### 4.1.3.2. Dicroísmo circular.

La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) es una técnica óptica que se ha utilizado ampliamente en los estudios de estructuras de ácidos nucleicos y de estudios conformacionales del ADN.

El ADN puede sufrir cambios conformacionales como resultado del proceso de unión de diferentes compuestos, por lo que esta técnica se ha convertido en una herramienta muy útil para monitorizar estos cambios conformacionales que resultan de la unión de compuestos de distinta naturaleza. Además, posee gran potencial para ser una plataforma de descubrimiento de fármacos.

Se pueden detectar alteraciones conformacionales del ADN mediante la espectroscopia de dicroísmo circular inducidas por los compuestos de rutenio. El espectro obtenido mediante espectroscopia de dicroísmo circular del *ct*-DNA muestra dos bandas características: una banda positiva a 286 nm debido al apilamiento de bases y, una banda negativa a 246 nm debido a la helicidad<sup>109</sup>. Ambas bandas son altamente sensibles a la interacción del ADN con moléculas pequeñas<sup>110</sup>.

Cuando se produce una interacción de tipo intercalativa dichas bandas a 286 y 246 nm se ven afectadas como ocurre en el caso de los intercaladores clásicos, como por ejemplo, el azul de metileno<sup>111</sup>.

---

<sup>109</sup> A) O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P.J. Sadler, V. Brabec. *Biochemistry*. **2003**, 42, 11544. B) Y. M. Chang, C. K. M. Chen, M. H. Hou. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 3394.

<sup>110</sup> P. Uma Maheswari, M. Palaniandavar. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 219.

<sup>111</sup> B. Norden, F. Tjernelund. *Spectroscopy Biopolymers*. **1982**, 21, 1713.

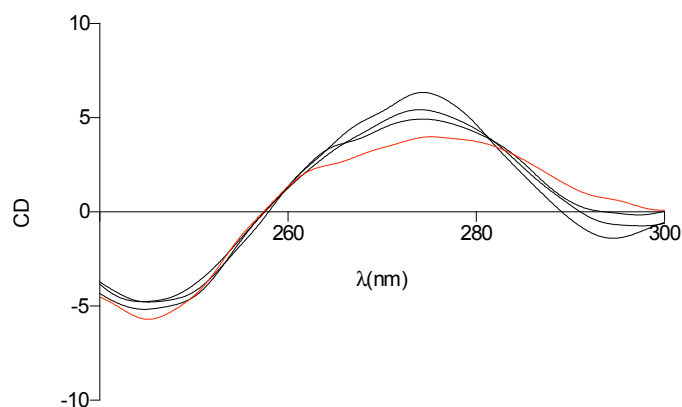


Figura 43. Espectro de dicroísmo circular del ADN en presencia de concentraciones crecientes del complejo **1b**, en 10mM Hepes pH 7,4 a temperatura ambiente. En color rojo se presenta el espectro del ADN en ausencia de **1b**.

Los estudios realizados para los compuestos **1b** y **1e** son consistentes con los resultados obtenidos por espectroscopia ultravioleta visible debido a que, tanto la banda positiva como negativa se vieron afectadas por la presencia de los compuestos. De modo que los resultados indican que la interacción de los compuestos con el *ct*-ADN se lleva a cabo mediante intercalación. Además, en las estructuras de ambos compuestos hay fragmentos de carácter planar que pudieran estar involucrados en la intercalación.



#### 4.1.4. Estudio computacional de estructura e interacción con el ADN.

El docking es un algoritmo computacional automatizado que determina cómo se puede unir un compuesto a una biomolécula. A través de procesos específicos, cada algoritmo de acoplamiento trata de ubicar el compuesto en múltiples orientaciones y conformaciones diferentes en la cavidad seleccionada de la biomolécula, y luego calcula la energía de acoplamiento o scoring para cada uno. El scoring, que determina la energía de enlace entre el compuesto y la cavidad, es el resultado más importante del proceso de acoplamiento.

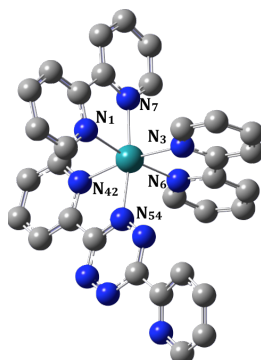
Estos resultados están directamente relacionados con la calidad de la estructura cristalográfica del ADN y con la estructura del compuesto. Puesto que incluso las mejores estructuras cristalográficas a menudo no contienen la cantidad real de hidrógenos, éstos tendrán que ser añadidos, a diferencia de las moléculas de agua que, por lo general, se eliminan (a excepción de las moléculas de aguas estructurales). Con respecto al compuesto se ha de verificar, por ejemplo, qué enlaces pueden rotar, la posición de los átomos, así como establecer qué átomos son susceptibles de formar enlaces de hidrógeno. Además es necesario revisar la carga de átomos metálicos, si es el caso, ya que este factor de carga puede contribuir en gran manera a la magnitud de la interacción.

Para llevar a cabo el estudio de acoplamiento se delimita una región en la que se realizará el proceso y dado que los cálculos de acoplamiento pueden llevar una cantidad de tiempo considerable, se fija una distancia de corte (es generalmente una caja rectangular) donde no hay interacciones posibles entre el compuesto y las partes de la biomolécula más allá de esa distancia.

Hay que tener en cuenta que el estudio computacional de acoplamiento no considera factores de biodisponibilidad, toxicidad, etc. El docking es probablemente la herramienta más utilizada en el diseño de fármacos a nivel computacional.

Teniendo en cuenta que el ADN es una de las dianas biológicas más importantes, se procedió a estudiar la interacción entre los compuestos **1b** y **1e-1j** con el ADN *in silico* mediante docking molecular.

Para llevar a cabo el estudio de acoplamiento se utilizó el PDB del ADN 1z3f obtenido de la base de datos *Protein Data Bank*. En cuanto a las estructuras se emplearon las obtenidas mediante difracción de rayos x de monocristal, sin embargo, en el caso del compuesto **1f** no fue posible obtener la estructura cristalina por lo que se realizaron los cálculos computacionales correspondientes. Las distancias de enlace obtenidas mediante el cálculo teórico para esta especie fueron comparadas con los valores experimentales de la estructura cristalina del compuesto **1k**. Estas distancias resultaron ser muy próximas, lo que permitió validar el uso de la estructura obtenida mediante cálculos computacionales en el estudio de acoplamiento. A continuación se muestra la estructura obtenida para **1f** mediante dichos cálculos teóricos.



Distancias de enlace Ru-N de <b>1f</b> (Å)	Distancias de enlace Ru-N de <b>1k</b> (Å)
Ru-N <sub>1</sub> = 2,1120	2.057(4)
Ru-N <sub>7</sub> = 2,098	2.085(4)
Ru-N <sub>3</sub> = 2,107	2.051(4)
Ru-N <sub>6</sub> = 2,089	2.063(4)
Ru-N <sub>42</sub> (Tzn) = 2,096	2.060(4)
Ru-N <sub>54</sub> (Tzn) = 2,033	1.972(4)

Tabla 6. Distancias de enlace Ru-N de los compuestos **1f** y **1k**.

En el caso de los compuestos **1b** y **1e** los resultados evidencian que ambos interaccionan mediante intercalación debido a que las energías de unión con el ADN son más favorables para la intercalación que para la unión con el surco menor del ADN. Sin embargo, los resultados indican que los compuestos **1f-1j** interaccionan con el surco menor del ADN, cuya morfología hace posible una mayor densidad de grupos fosfato en comparación con el surco mayor permitiendo así una mejor interacción con compuestos de carácter catiónicos<sup>112</sup>. Los resultados están en concordancia con los obtenidos mediante espectroscopia de ultravioleta visible y de dicroísmo circular, y las energías de unión se presentan a continuación. Algunos ejemplos de estructuras complejo ADN se presentan en la figura 44.

Compuesto	Docking molecular score (KJ/mol)
1b	-202
1e	-163
1f	-152
1g	-172
1h	-185
1i	-186
1j	-179

Tabla 7. Energía de unión entre los compuestos **1b**, y **1e-1j**.

<sup>112</sup> K. Kruger Woods, T. Lan, L.W. McLaughlin, L.D. Williams. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 1536.

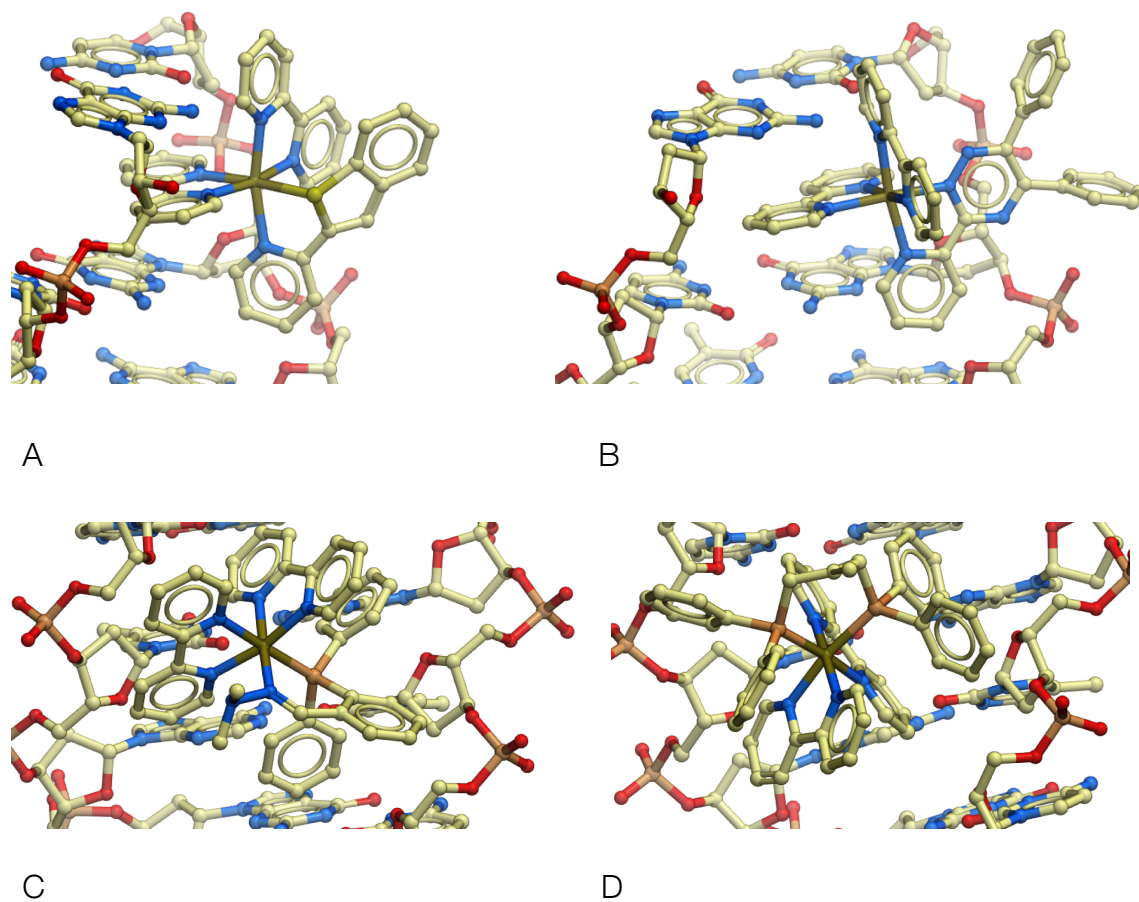
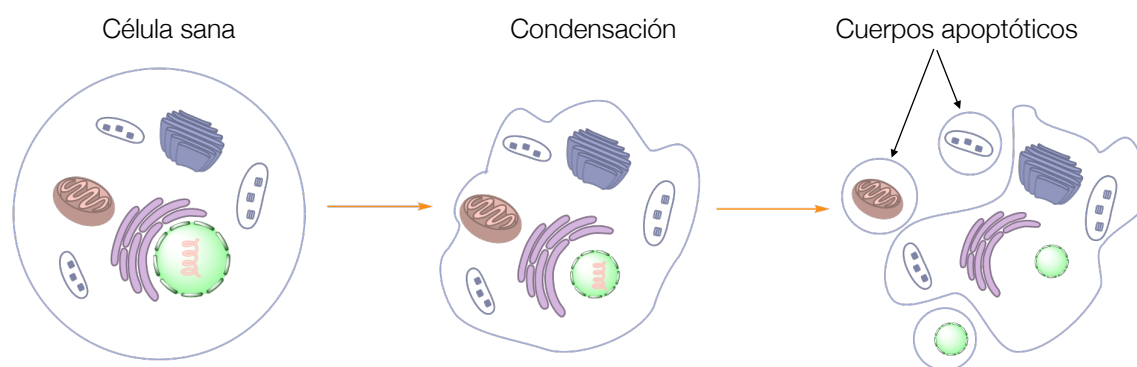


Figura 44. Sección de parte de la estructura ADN-Compuesto resultado de la interacción calculada mediante docking. A: complejo **1e**-ADN, B: complejo **1b**-ADN, C: complejo **1g**-ADN y D: complejo **1j**-ADN. Se ha omitido la cadena completa de ADN para una mejor visualización de la interacción.

#### 4.1.5. Estudios del mecanismo de muerte celular.

Con el fin de conocer el mecanismo de acción de los compuestos mononucleares de rutenio derivados de bipyridina **1f-1j**, se estudió la inducción de procesos apoptóticos sobre la línea celular A2780.

La muerte celular por apoptosis puede producirse cuando el organismo la requiere para su desarrollo o por daño irreparable de la célula. La muerte se produce por la activación de una serie de mecanismos que desembocan en modificaciones morfológicas que incluyen la condensación de la cromatina, del citoplásmica y finalmente a la ruptura de la célula en los denominados cuerpos apoptóticos<sup>113</sup>.



*Figura 45. Esquema del proceso de apoptosis.*

Mediante el reactivo Hoechst 33258, que es un compuesto que se une al ADN preferentemente en las regiones adenina-timina (A-T), se puede detectar el daño nuclear y la apoptosis. Los núcleos normales muestran una cromatina no condensada uniformemente distribuida por todo el núcleo, mientras que los núcleos apoptóticos muestran cromatina condensada o fragmentada. Además, consecuencia del proceso de apoptosis se produce la formación de fragmentos de la célula llamados cuerpos apoptóticos que también pueden visualizarse mediante este método.

<sup>113</sup> D. A. Gewirtz, S. E. Holt, S. Grant. Apoptosis, Senescence, and Cancer 2007 Humana Press Inc. Totowa (New Jersey).

En la figura 46 se observa un claro aumento de los marcadores apoptóticos, como la condensación de la cromatina, anomalías de la estructura nuclear y cuerpos apoptóticos.

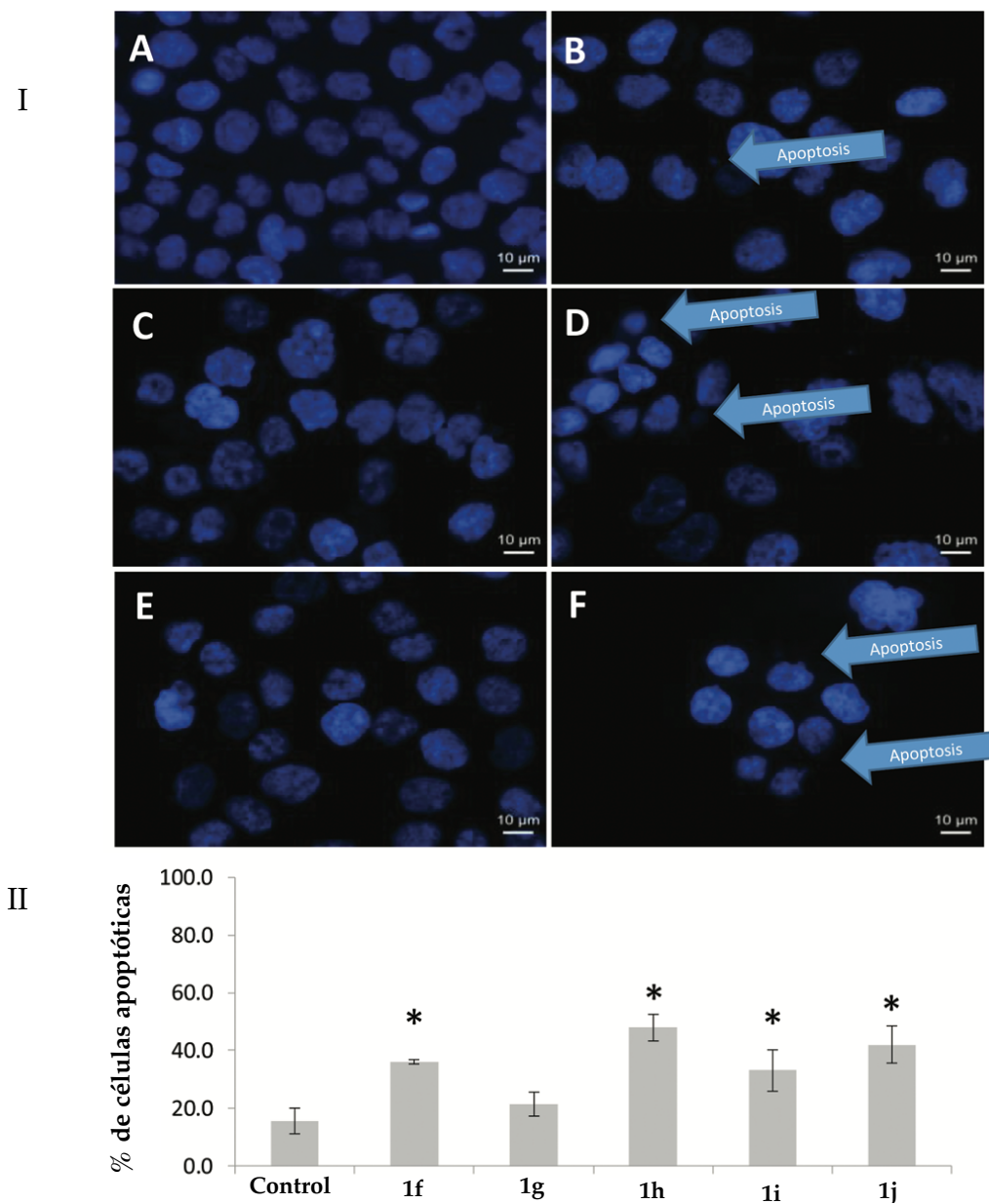


Figura 46. I) Visualización de núcleos apoptóticos en la línea celular A2780 en presencia de: (A) control DMSO, (B) compuesto **1f**, (C) compuesto **1g**; (D) compuesto **1h**; (E) el compuesto **1i** y (F) el compuesto **1j**. II) % De células apoptóticas después de la exposición a línea celular A2780 al vehículo de control (DMSO) y a los compuestos **1f**- **1j**.

A pesar de la presencia de estos indicadores apoptóticos, el nivel de muerte celular debido a la apoptosis observada en la Figura 46 para cada compuesto no parece muy acusada, por ello, se postuló que estos compuestos pueden inducir otros tipos de muerte celular programada (PCD), tales como la muerte celular por autofagia.

La autofagia se activa por condiciones de inanición asociadas a la deficiencia de nutrientes como por ejemplo aminoácidos, por condiciones hipóxicas o debido también a altas temperaturas. La autofagia es un proceso mediante el que las células se someten a autodigestión parcial, lo que permite prolongar la supervivencia durante un corto periodo de tiempo, proporcionando nutrientes que son necesarios para mantener la viabilidad celular<sup>114</sup>. La muerte celular autofágica se lleva a cabo mediante la formación de una membrana procedente de compartimentos celulares, como por ejemplo las mitocondrias, y que crece formando lo que se conoce como fagóforo que reconoce las estructuras celulares que van a ser degradadas. Estas membranas crecerán hasta unir sus extremos para formar un compartimento cerrado denominado autofagosoma. El autofagosoma puede fusionarse directamente con uno o más lisosomas, formando lo que se conoce como autolisosomas, en los que tiene lugar la degradación (en la que se producirán aminoácidos y ácidos grasos) que la célula finalmente reutilizará<sup>115</sup>.

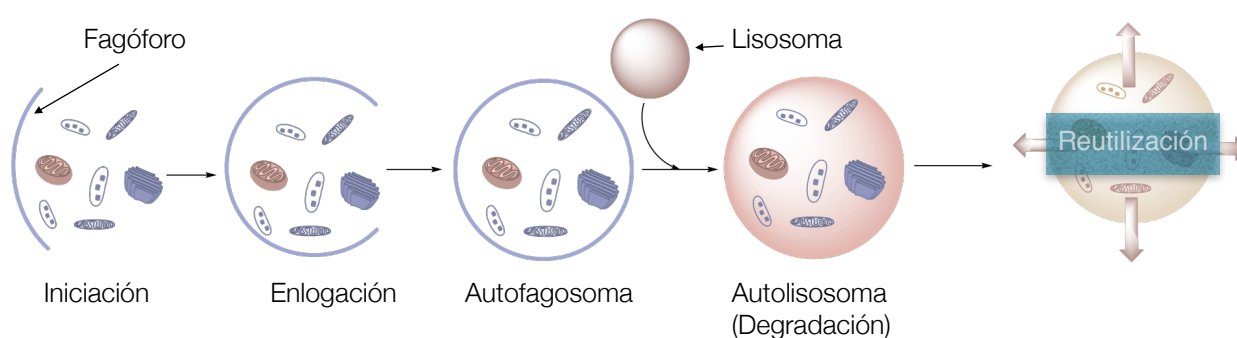


Figura 47. Esquema del proceso de autofagia.

<sup>114</sup> Y. Tsujimoto, S. Shimizu. *Cell Death Differ.* **2005**, 12, 1528.

<sup>115</sup> M.V. Jain, A.M. Paczulla, T. Klonisch, F.N. Dimgba, S.B. Rao, K. Roberg, F. Schweizer, C. Lengerke, P. Davoodpour, V.R. Palicharla, S. Maddika, M. Los. *Cell Mol Med.* **2013** 17, 12.

Tanto los autofagosomas como los autolisosomas pueden precisamente ser detectados mediante fluorescencia a través de la tinción con el reactivo Cyto-ID, así los procesos de autofagia pueden verificarse.

Para evaluar la autofagia inducida sobre la línea celular A2780 se empleó el ensayo CYTO-ID en presencia de DMSO como control y la rapamicina como marcador positivo de la autofagia.

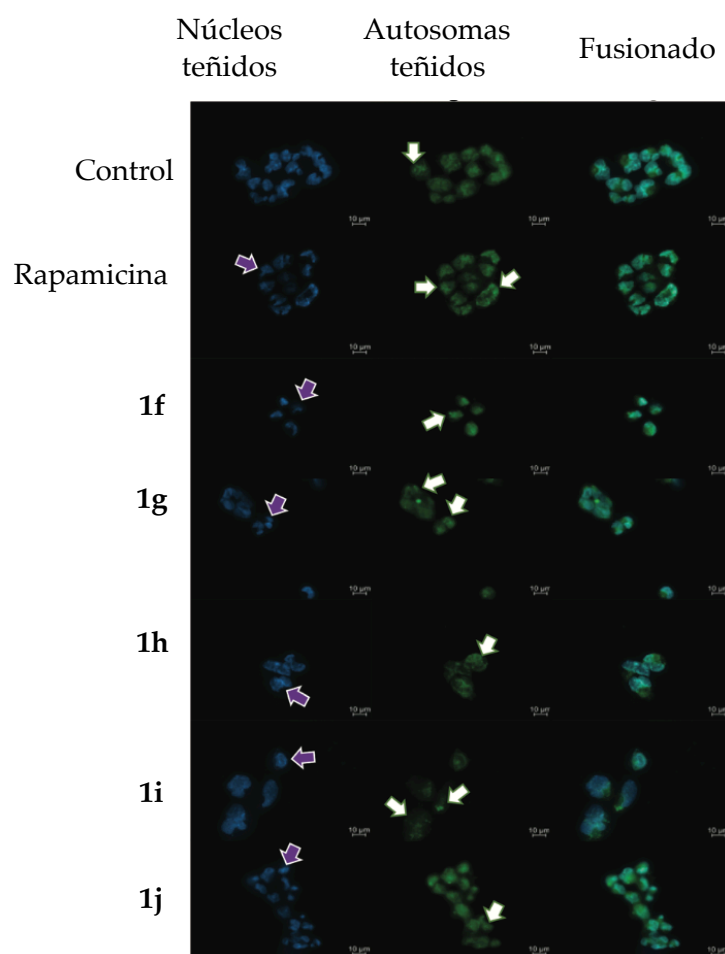


Figura 48. Evaluación de la muerte celular autofágica causada por los compuestos **1f-1j** y evaluados por microscopia de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI en azul, y los autofagolisosomas se tiñeron en verde. Las flechas blancas apuntan a la acumulación de autofagolisosomas y las flechas violetas apuntan a las células en apoptosis.



En la Figura 48 se aprecia que todos los compuestos inducen la acumulación de autofagolisosomas, una característica de la autofagia. Además, con la excepción del compuesto **1h**, todos los otros compuestos indujeron un nivel más alto de autofagia en comparación con la apoptosis en células A2870 expuestas durante 72 h a los compuestos.

Los compuestos inducen la hiperactivación de la autofagia y/o inducen la apoptosis, conduciendo así a la muerte de las células cancerígenas. Por ello son buenos candidatos para ser utilizados en futuros ensayos con el objetivo final de obtener un resultado aplicable en el tratamiento del cáncer. De hecho, se han descrito compuestos polifenólicos naturales, como la rottlerina, la genisteína, la quercetina, la curcumina y el resveratrol, que inducen la muerte celular no sólo a través de la apoptosis sino también a través de la autofagia<sup>116</sup>.

---

<sup>116</sup> N. Hasima, B. Ozpolat. *Cell Death Dis.* **2014**, 5, 1509.



#### 4.1.6. Toxicidad *in vivo* en el modelo pez cebra.

Uno de los principales objetivos de las compañías farmacéuticas es obtener fármacos capaces de mejorar la calidad y la duración de la vida de los pacientes. Por ello, en su desarrollo es fundamental realizar estudios de toxicidad *in vivo* previos a los estudios clínicos ya que, la detección precoz y la corrección de los problemas de toxicidad, permiten un óptimo desarrollo tanto de la fase preclínica como clínica.

La toxicidad es por lo tanto crítica para el éxito del desarrollo de un nuevo fármaco y, por esta razón, se le otorga una especial atención y prioridad a los estudios de toxicidad *in vivo*, dado que son el último indicador de toxicidad antes de iniciar el estudio clínico.

Estos estudios de toxicidad *in vivo* permiten orientar la optimización de la estructura del compuesto químico en desarrollo, ya que los resultados que se obtienen proporcionan la base para estimar la concentración que se prevé que cause tanto toxicidad como eficacia en el tratamiento en humanos. En muchos casos, una cierta toxicidad es tolerable si el fármaco proporciona ventajas importantes, puesto que algunos efectos tóxicos pueden ser reversibles en el cuerpo humano. No obstante debemos de tener en cuenta que los estudios de toxicidad son complementarios a los estudios de absorción, distribución, metabolismo y eliminación.

Los estudios de toxicidad *in vivo* que pueden ser de toxicidad aguda (dosis única) o toxicidad crónica (2 a 14 semanas, dosis diaria), que se diseñan después de testar distintas concentraciones del compuesto químico sobre el modelo animal, permiten determinar la concentración más alta que no produce toxicidad (NOEC), la concentración más baja que produce toxicidad (LOEC) y el valor de concentración que produce el 50% de mortalidad (LC<sub>50</sub>), en nuestro caso, mortalidad en embriones de pez cebra.

El pez cebra, y especialmente sus formas embrionarias, ha sido presentado como modelo para estudios de toxicología y desarrollo de fármacos. Numerosos estudios avalan el uso de esta especie como modelo para estudios de toxicología y desarrollo de fármacos<sup>117,118,119</sup>. Aunque tiene sus limitaciones, los resultados toxicológicos se pueden relacionar con los posibles efectos en mamíferos<sup>120,121,122,123</sup>, ya que el pez cebra y los mamíferos muestran relación en varias vías moleculares y celulares<sup>124,125</sup>. De esta manera, el modelo de pez cebra da pistas sobre los compuestos más interesantes y el orden de prioridad a seguir en las investigaciones futuras dentro de un grupo de fármacos<sup>126,118</sup>.

El pez cebra tiene varias ventajas para el estudio de la toxicidad debido a que en la edad adulta son capaces de realizar puestas de hasta 200 huevos y su mantenimiento es relativamente sencillo. Además, en comparación con los modelos de mamíferos, el desarrollo embrionario es relativamente rápido (figura 49).

---

<sup>117</sup> A) S. Ali, D.L. Champagne, H.P. Spaink, M.K. Richardson. *Birth Defects Res. Part. C.* **2011**, 93, 115. B) C.A. MacRae, R.T. Peterson. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, 14, 721.

<sup>118</sup> J.L. Tan, L.I. Zon, *Methods Cell Biol.* **2011**, 105, 493.

<sup>119</sup> A) C.W. McCollum, N.A. Ducharme, M. Bondesson, J.A. Gustafsson, *Birth Defects Res. Part. C.* **2011**, 93, 67. B) L. Truong, S.L. Harper, R.L. Tanguay, *Methods Mol. Biol.* **2011**, 691, 271. C) S. Jin, K.S. Sarkar, Y.N. Jin, Y. Liu, D. Kokel, T.J. Van Ham, L.D. Roberts, R. E. Gerszten, C.A. Macrae, R.T. Peterson. *J. Biomol. Screening.* **2013**, 18, 108.

<sup>120</sup> P. McGrath, C.Q. Li. *Drug Discovery Today.* **2008**, 33, 394.

<sup>121</sup> S. Berghmans, P. Butler, P. Goldsmith, G. Waldron, I. Gardner, Z. Golder, F.M. Richards, G. Kimber, A. Roach, W. Alderton, A. Fleming. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **2008**, 58, 59.

<sup>122</sup> A) G. Kari, U. Rodeck, A.P. Dicker. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, 82, 70. B) K.C. Brannen, J.M. Panzica-Kelly, T.L. Danberry, K.A. Augustine-Rauch. *Birth Defects Res. Part B.* **2010**, 89, 66. C) S. Ali, H.G.J. van Mil, M.K. Richardson. *PLoS One.* **2011**, 6(6), e21076.

<sup>123</sup> I. W. Selderslaghs, R. Blust, H.E. Witters. *Reprod. Toxicol.* **2012**, 33, 142.

<sup>124</sup> L. I. Zon, R.T. Peterson. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 35.

<sup>125</sup> A) C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling. *Dev. Dyn.* **1995**, 203, 253. B) K. Dooley, L.I. Zon, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, 10, 252.

<sup>126</sup> J.L. Tan, L.I. Zon. *Methods Cell Biol.* **2011**, 105, 493.

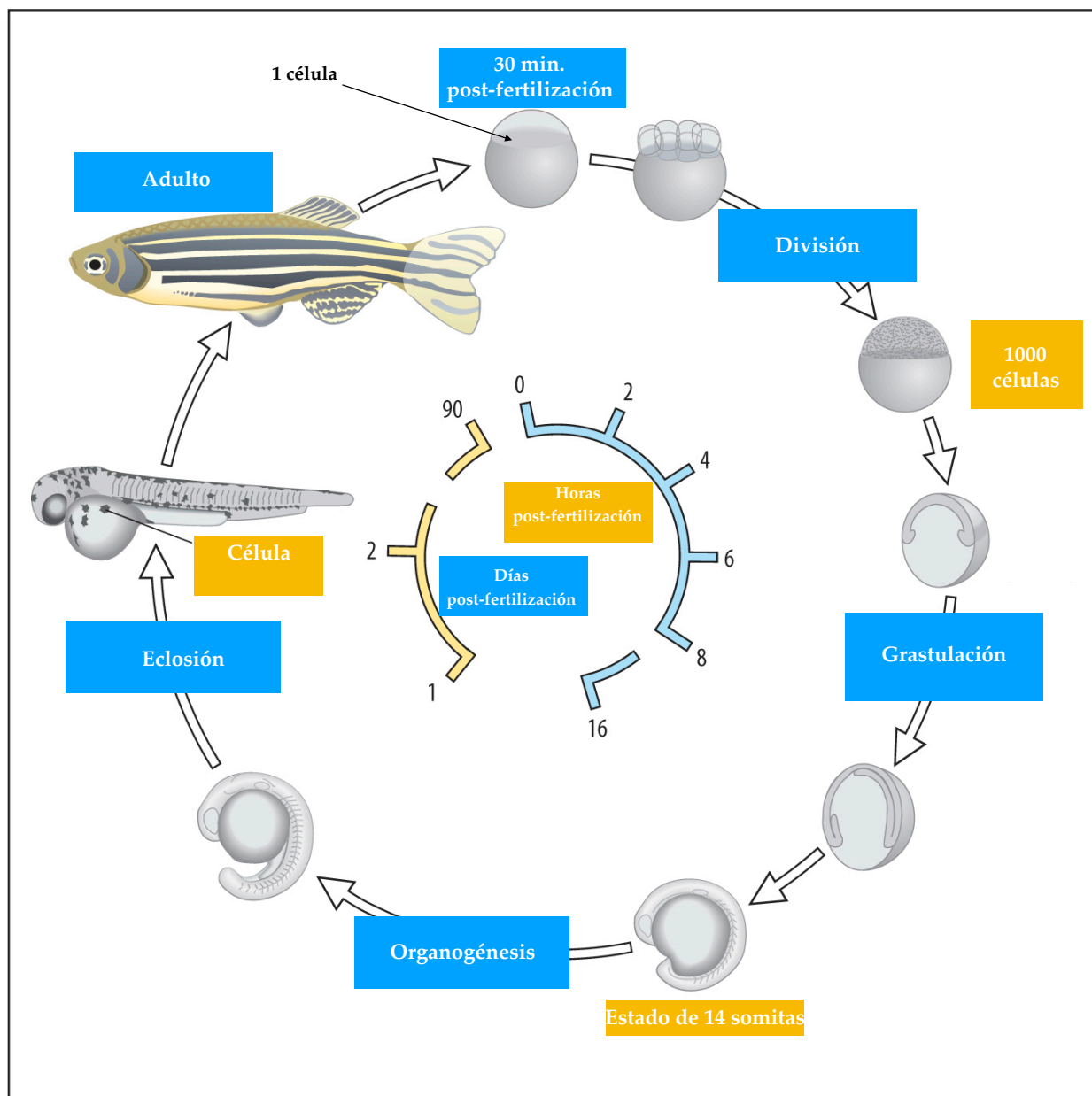
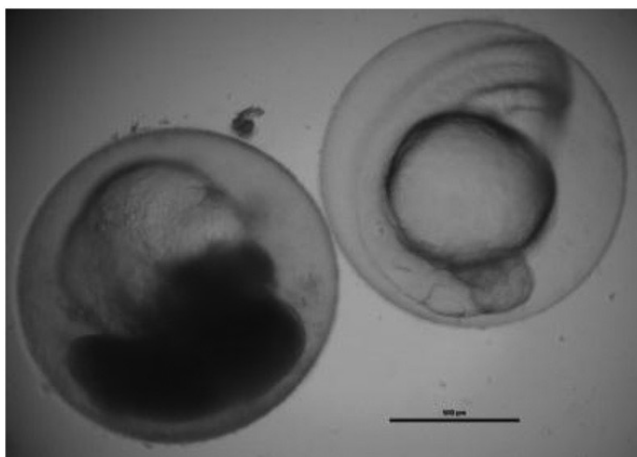


Figura 49 . Desarrollo embrionario del pez cebra.

Otra ventaja que presenta este modelo tiene que ver con el pequeño tamaño del embrión y la cantidad requerida de compuesto para la evaluación de la toxicidad que, en comparación con los modelos de mamíferos es mucho menor, lo cual es importante debido a que la cantidad que se sintetiza de nuevos compuestos es limitada. Por otra parte, la disponibilidad de un gran número de embriones de pequeño tamaño permite que el estudio de toxicidad se lleve a cabo en microplacas, permitiendo cierto grado de automatización, pero sobre todo facilita el trabajo de laboratorio. Esto ha llevado al uso

del pez cebra como modelo para evaluar los efectos tóxicos de compuestos químicos en proceso de desarrollo farmacéutico, de modo que en nuestro caso, se utilizaron embriones de pez cebra para la evaluar la toxicidad *in vivo* (LC<sub>50</sub>) de los compuestos de rutenio **1f-1i**.



*Figura 50. Embrion coagulado (izquierda) y en desarrollo normal (derecha) a 24 hpf. Escala 500  $\mu$ m.*

Las concentraciones analizadas fueron diferentes dependiendo de los resultados preliminares de cada compuesto. De esta manera, para **1f** las concentraciones analizadas fueron 2.5, 5, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>; para **1g** fueron 75, 150, 225, 300 y 375 mg L<sup>-1</sup>; para **1h** fueron 20, 40, 60, 80 y 100 mg L<sup>-1</sup>; para **1i** fueron 15, 25, 35, 45 y 60 mg L<sup>-1</sup> y finalmente, para **1i**, las concentraciones utilizadas fueron 12.5, 25, 50, 100 y 150 mg L<sup>-1</sup>. El tratamiento tuvo una duración de 72 h durante las cuales, para cada caso y cada 24 h, fue evaluada la supervivencia (figura 51).

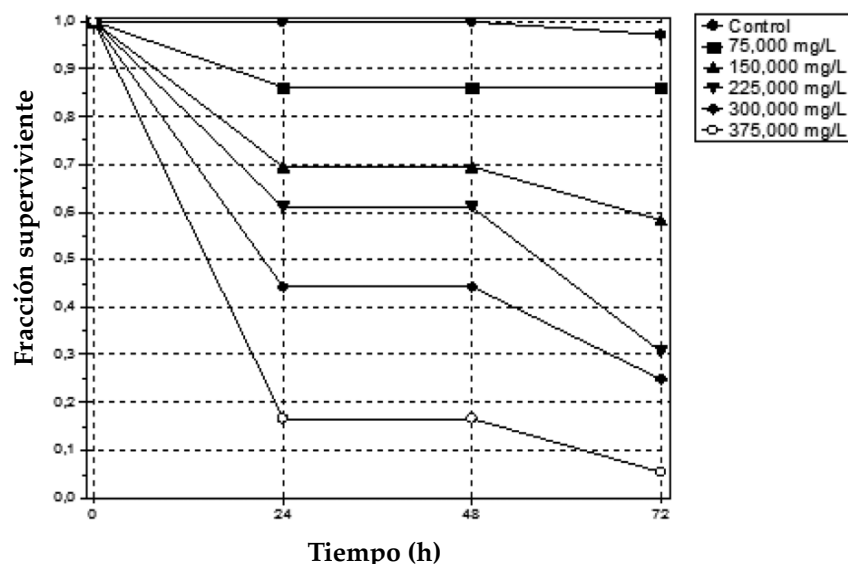


Figura 51 . Supervivencia observada en presencia de 1g.

Posteriormente, los datos observados a las 72 h se emplean como base para obtener los resultados de  $LC_{50}$  de los experimentos mediante el uso de la curva de *dosis-respuesta*. Los resultados de NOEC y LOEC se obtienen directamente de los resultados obtenidos a partir de las concentraciones testadas en el experimento.

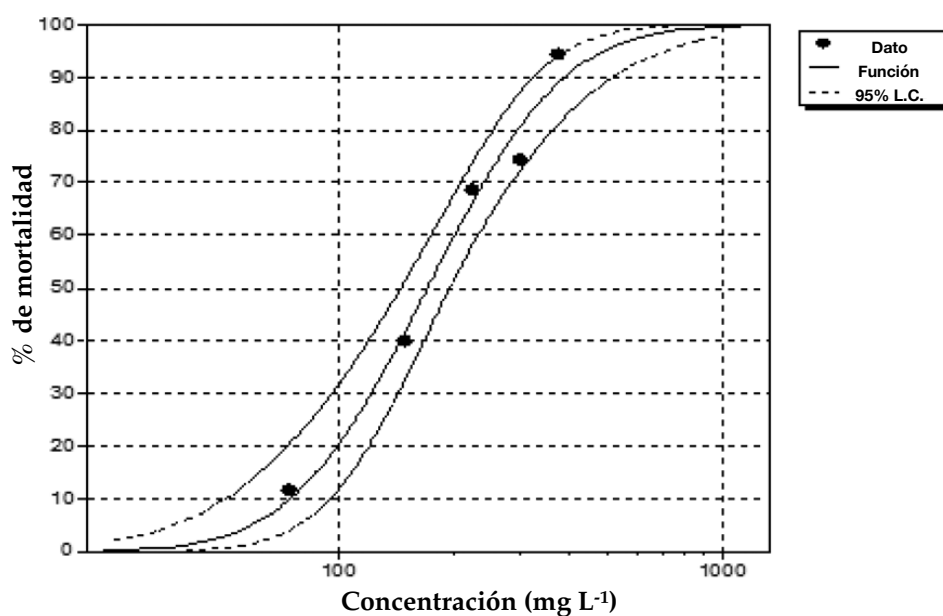


Figura 52 . Curva dosis-respuesta observada en presencia de 1g.

A la vista de los resultados de toxicidad (Tabla 8), el mejor compuesto mononuclear de Ru(bipy)<sub>2</sub> es **1g**, que claramente muestra la menor toxicidad *in vivo* y unos buenos valores de toxicidad *in vitro*, con valores de IC<sub>50</sub> para las líneas MCF7 y A2780 de 25.4 ± 9.0 y 18.5 ± 5.5 μM respectivamente. A continuación, se podrían proponer más estudios relacionados con el desarrollo farmacológico de los compuestos **1h**, **1i** y **1j**.

Cabe destacar que los compuestos de rutenio se postulan como sustitutos de los compuestos de platino en la quimioterapia del cáncer, por ello, el valor obtenido en el compuesto **1g** es bastante prometedor dado que para el *cis-platino* se obtuvo un valor de LC<sub>50</sub> de 198,2 mg L<sup>-1</sup> a las 72 h, que está dentro del mismo rango que el resultado obtenido para **1g**.

Compuesto	LC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	NOEC (mg L <sup>-1</sup> )	LOEC (mg L <sup>-1</sup> )
1f	8.67	2.50	5.00
1g	170.30	75.00	150.00
1h	43.14	20.00	40.00
1i	37.82	15.00	25.00
1j	49.58	25.00	50.00

Tabla 8. Toxicidad *in vivo* en el modelo de pez cebra de los compuestos **1f-1j**.

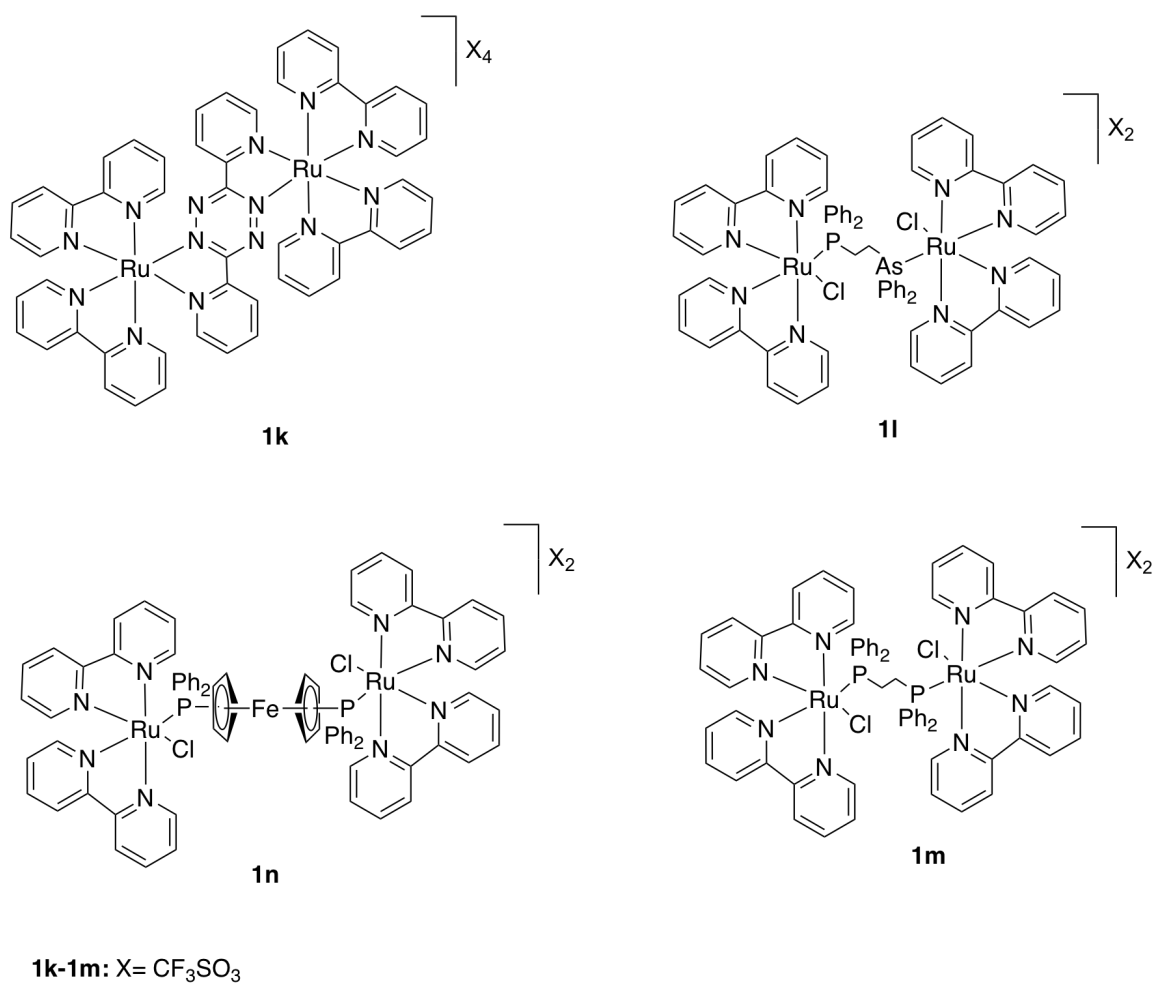


## 4.2. Compuestos dinucleares de rutenio derivados de bipyridina.

### 4.2.1. Determinación estructural.

La obtención de los compuestos dinucleares derivados de bipyridina se llevó a cabo mediante un procedimiento sintético similar al empleado para los compuestos mononucleares mediante el tratamiento del precursor de rutenio *cis*-[Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] con trifluorometanosulfonato de plata y los ligandos seleccionados en relación 2:1 (precursor:ligando) salvo para el compuesto **1k** donde la relación es 4:1, (ver sección experimental apartado 3.3.2). De esta forma se obtuvieron las especies dinucleares de rutenio **1k-1m** como sólidos estables para los que se obtuvieron buenos rendimientos (entre un 90 y 74 %) y cuyas estructuras se presentan a continuación.

El análisis elemental de los productos obtenidos es coherente con la formulación presentada para el complejo **1k** [Ru(bipy)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>(L)[X]<sub>4</sub> y para los compuestos [Ru(bipy)<sub>2</sub>X]<sub>2</sub>(L)[X]<sub>2</sub>, **1l-1m** (L = ligando bidentado; X = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>).



Las medidas de conductividad realizadas en etanol indican que los compuestos **1l-1m** son electrolitos 1:2 y el compuesto **1k** es un electrolito 1:4. Estos resultados confirman la formulación planteada sobre la base de que dichas especies están formadas por un catión complejo de Ru(II), dos contraiones triflato para los complejos **1l-1m** y cuatro para el complejo **1k**.

La espectrometría de masas muestra en todos los casos, y además con una elevada intensidad, las señales correspondientes a los cationes complejos resultantes de

la pérdida de uno y dos contraiones triflato. Además, en todos los casos es posible indentificar los fragmentos correspondientes a las especies mononucleares de ruténio  $[(Ru(bipy)_2(ligando))]^+$  para el compuesto **1k** y  $[(Ru(bipy)_2Cl(ligando))]^+$  para los compuestos **1l-1m**.

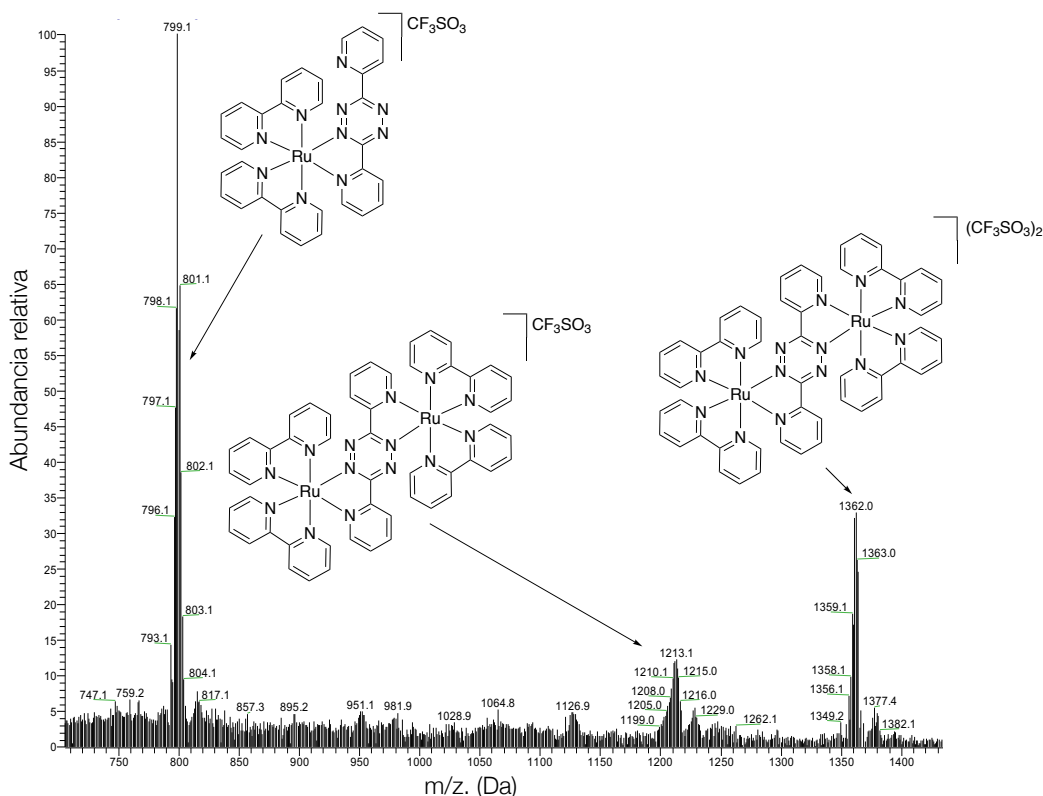


Figura 53. Espectro de masas del compuesto **1k**.

Los espectros de IR muestran, al igual que en los compuestos mononucleares, la bandas de vibración de los enlaces C=C, C=N y C-H, características de los anillos de piridina y fenilo.

También se han podido asignar cuatro bandas intensas, relacionadas con la presencia del contraión triflato. Dos de ellas corresponden a los modos  $\nu[SO_3(E)]$  y  $\nu[SO_3(A1)]$ , que por lo general se registran en el intervalo 1265 y 1030  $cm^{-1}$ , y otras dos corresponden a los modos  $\nu[CF_3(A1)]$  y  $\nu[CF_3(E)]$ , entre 1260 y 1165  $cm^{-1}$ .

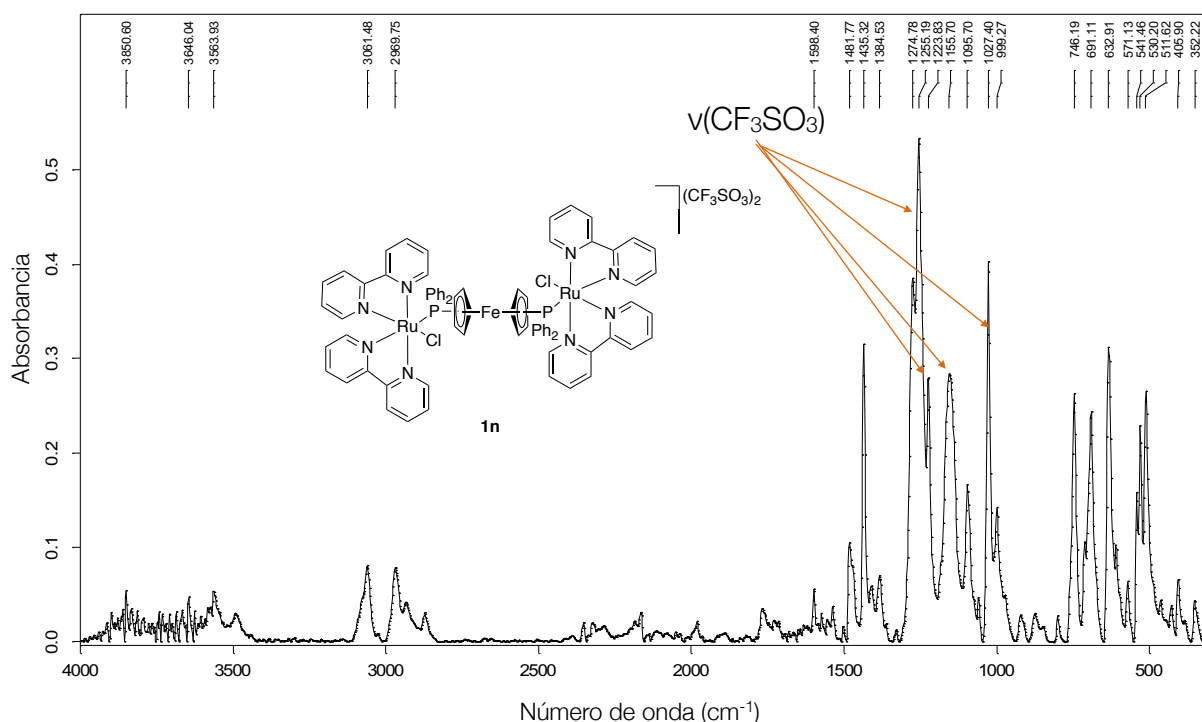


Figura 54. Espectro de IR del compuesto **1n**.

En el caso de las especies dinucleares, los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  resultan más complejos que los de las especies mononucleares comentadas anteriormente, ya que se registran un gran número de señales en una pequeña zona del espectro. En los espectros **1l-1m** la resonancia de los protones fenólicos se superponen con las de los protones de las piridinas. En el caso del complejo **1k**, los protones del ligando tetrazina presentan unos desplazamientos químicos muy parecidos a los protones de los ligandos bipyridilo del precursor, de modo que el grado de solapamiento es muy elevado.

Mediante la comparación entre los espectros del precursor  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ , el ligando y el compuesto obtenido, podemos determinar, por un lado, que las señales registradas del compuesto final no coinciden con ninguna señal atribuida al precursor ni al ligando y, por otro lado, que la integración de las señales del complejo final coincide en todas las especies con el número de protones esperado para cada compuesto, por lo que es posible concluir que se ha producido la coordinación de los ligandos puentes al metal.

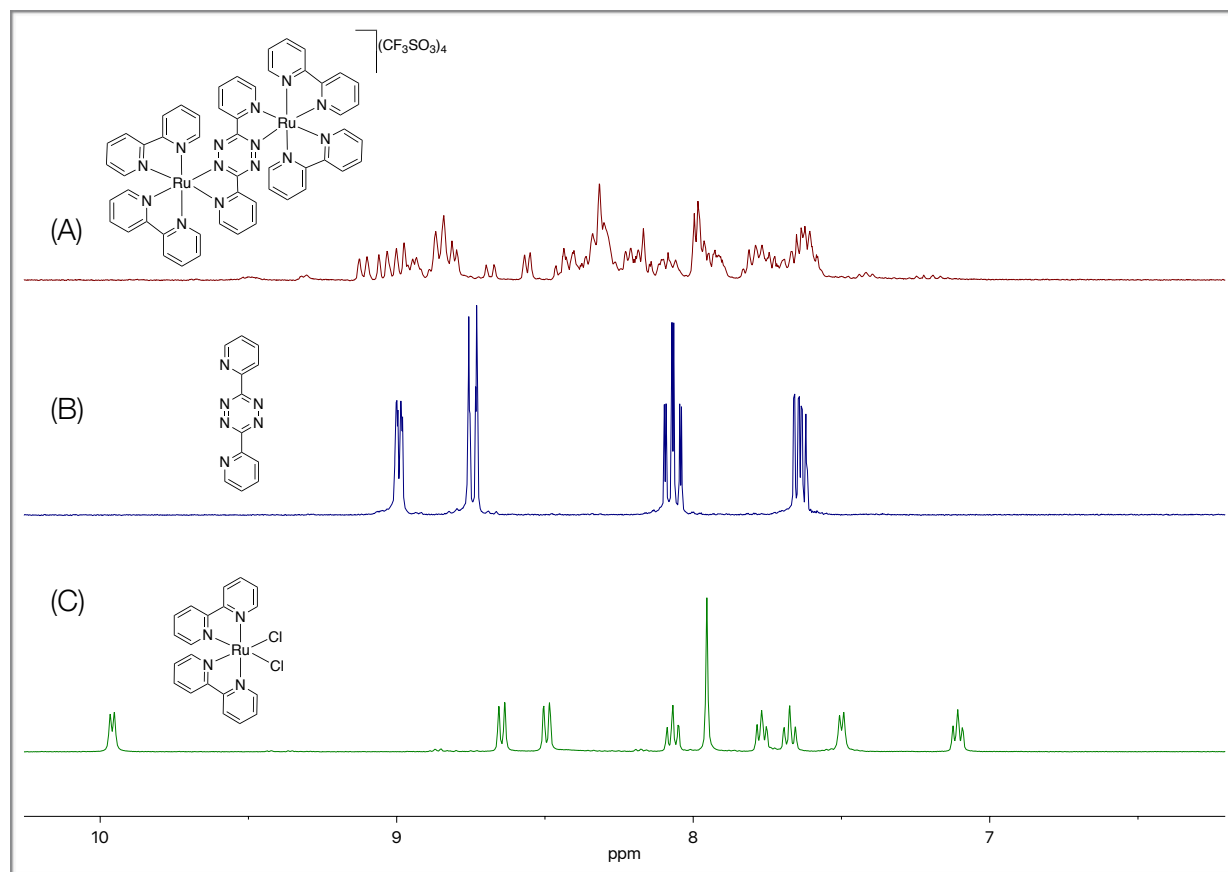


Figura 55. Superposición de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  del complejo **1k** (A), el ligando 5,6-difenil-3-(piridin-2-il)-1,2,4-tetrazina (B) y , el complejo precursor  $\text{cis-[Ru(bipy)}_2\text{Cl}_2\text{]}$  (C).

En el espectro RMN de  $^1\text{H}$  de los compuestos **1l** y **1m**, es posible identificar las señales de los grupos  $-\text{CH}_2$  de los ligandos fosfina, que para el caso del compuesto **1l** se registran a 5.30 ppm y para el compuesto **1m** a 3.50 ppm.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **1n** se observa, que al igual que su homólogo mononuclear, las señales asignadas a los protones del ferroceno se pueden identificar claramente, registrándose en el intervalo 3.71-2.77 ppm.

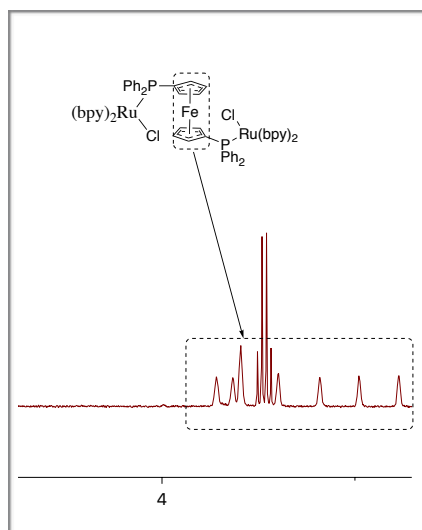


Figura 56. Espectro parcial de RMN de  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  del complejo **1n**.

Los espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  de los complejos **1l** y **1m** presentan un único singlete a 44.95 y 38.43 ppm respectivamente, desplazados a campo bajo con respecto a la señal de la correspondiente fosfina libre, lo que indica la coordinación de los átomos de fósforo al centro metálico. Además, la presencia de una única señal es indicativa de la equivalencia de los dos átomos de fósforo.

Compuesto	$\delta(\text{P})(\text{ppm})$	$\delta(\text{P})_{\text{Fosfina libre}} (\text{ppm})$
<b>1l</b>	44.95	-11.9
<b>1m</b>	38.43	-15.3
<b>1n</b>	41.90; 41.72	-16.5

Tabla 9. Datos de espectroscopia de RMN  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  para los compuestos **1l-1n**.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **1n** es mucho más complejo que el de los compuestos **1k-1m**, puesto que se distingue un mayor número de señales (por ejemplo, la zona de resonancia de los hidrógenos de los anillos de ciclopentadienilo presenta siete señales, 6 que integran por 1H y una que integra por 2H, mientras que en el compuesto análogo mononuclear sólo se detectan 4 señales en la que cada una integra por 1H) ya que cada átomo de rutenio puede tener configuración absoluta  $\Delta$  o  $\Lambda$  debido a la presencia de los anillos quelato en su entorno, y la síntesis puede conducir a

la obtención de un par de enantiómeros y un complejo meso. A la vista de los resultados obtenidos por espectroscopia de RMN, parece que, en el caso del compuesto **1n** se han obtenido una mezcla de todos los isómeros posibles. Esto se ve corroborado por la presencia de dos señales singlete en el espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ .

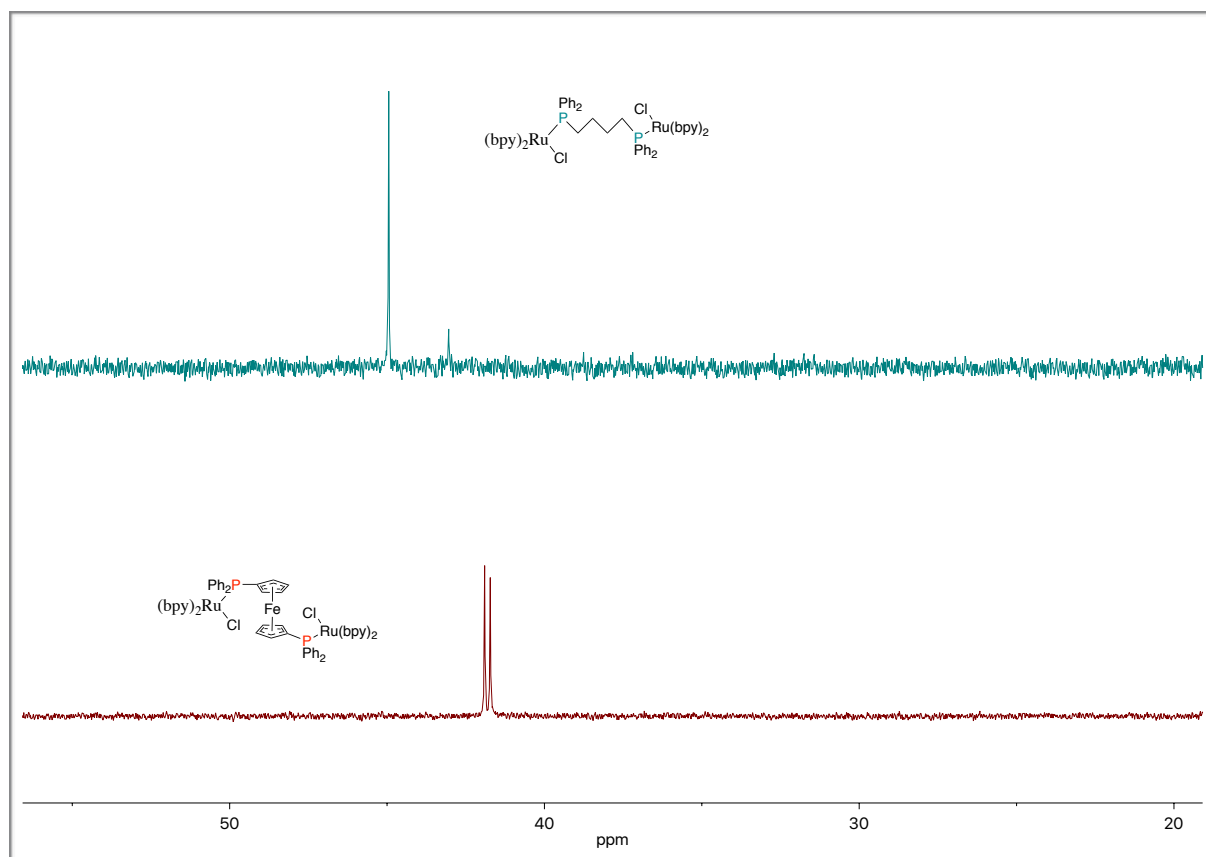


Figura 57. Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  de los complejos **1m** (arriba) y **1n** (abajo).

La resolución por difracción de RX de la estructura cristalina de los compuestos **1k**, **1l** y **1n** confirma la estructura propuesta a partir de los datos espectroscópicos. Los monocristales de **1k**, **1l** y **1n** adecuados para ello han sido obtenidos mediante difusión lenta de *n*-hexano sobre una disolución de diclorometano de los correspondientes complejos. Los datos cristalográficos significativos se dan en la Tabla 19 y 20 del Anexo I y una selección de las distancias y ángulos de enlace seleccionados en la Tabla 25 del Anexo II.

La unidad asimétrica de los compuestos contiene media molécula del catión complejo dinuclear, un contraión de trifluorometanosulfonato para los complejos **1l** y **1n** y dos contraiones para el compuesto **1k**, cuya estructura completa se ha generado por inversión con respecto a un punto localizado en el anillo central del ligando puente. En el caso del complejo **1k** la unidad asimétrica contiene dos cationes moleculares y cuatro aniones de trifluorometanosulfonato. Además, todas las unidades asimétricas contienen moléculas de algún disolvente utilizado en el proceso de síntesis y aislamiento de los productos: dos moléculas de acetona para el compuesto **1k**, media molécula de agua para el compuesto **1l** y media molécula de etanol para el compuesto **1n**.

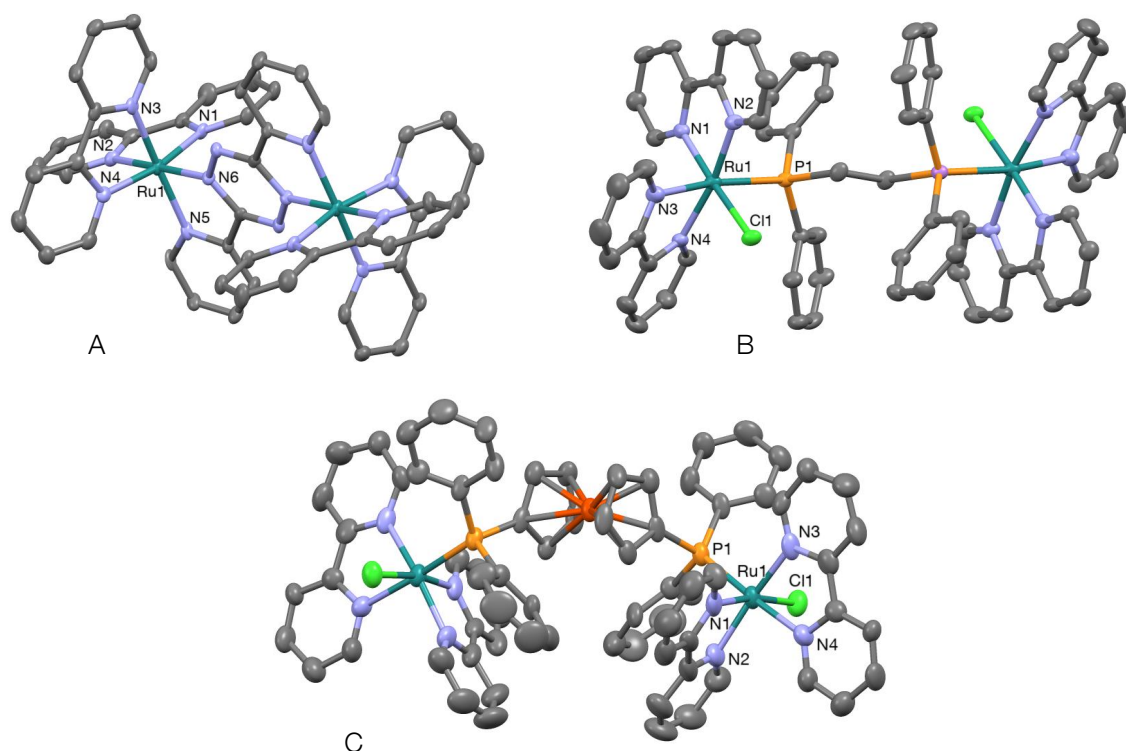


Figura 58. Estructura cristalina del catión molecular del compuesto **1k** (A), **1l** (B) y **1n** (C).

En todos los cationes complejos el átomo de rutenio(II) presentan una geometría octaédrica distorsionada, enlazado a dos moléculas de 2,2-bipiridina que actúan como ligandos quelato. La esfera de coordinación del metal en el compuesto **1k** se completa



con un ligando puente, 5,6-difenil-3-(piridin-2-il)-1,2,4-tetrazina, que actúa como bidentado quelato con respecto a cada uno de los átomos de rutenio. En los compuestos **1l** y **1n** el entorno de Ru se completa con un átomo de cloro como ligando terminal y un ligando puente (2-(diphenilarsinil)etil)difenilfosfina para el compuesto **1l**, y 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno para el compuesto **1n**.

La presencia de los anillos quelatos hace que estos compuestos dinucleares de rutenio puedan tener dos configuraciones,  $\Delta$  y  $\Lambda$ . Los complejos **1k**, **1l** y **1n** cristalizan en grupos espaciales centrosimétricos por lo que en el cristal están presentes ambos enantiómeros. Sin embargo, el complejo **1n** cristaliza en el grupo espacial centrosimétrico (C2/m) lo que implica que contenga el isómeros  $\Delta, \Delta$  y su enantiómero  $\Lambda, \Lambda$ .

Los fragmentos Ru(bipy)<sub>2</sub> presentan una geometría muy similar en todos los complejos, con distancias Ru-N en el intervalo 2.048-2.085 Å, correspondiente a los enlaces Ru(1)-N(1) en **1l** y Ru(1)-N(2) en **1k**, respectivamente. Las distancias más largas corresponden a los enlaces Ru-N en la posición *trans* a los átomos fósforo y arsénico, poniendo de manifiesto la mayor influencia *trans* de dichos átomos. Cabe destacar que la distancia Ru(1)-N(6) entre el rutenio y uno de los nitrógenos de la tetrazina en el complejo **1k** es considerablemente más corta en comparación con los demás enlaces Ru-N, con un valor de 1.972 Å.

Los ligandos bipyridina son responsables de la distorsión de la geometría de coordinación octaédrica, ya que imponen ángulos de enlace N-Ru-N en el intervalo 77.6-79.5° (para los enlaces N(3)-Ru(1)-N(4) en **1l** y N(1)-Ru(1)-N(2) en **1n**, respectivamente), debido a su naturaleza quelatante, que difieren del valor ideal de 90° esperado para un octaedro regular.

En general los ligandos bipyridina son planos y coplanarios con el quelato de cinco miembros que forman con el átomo de rutenio, aunque presentan ligeras distorsiones por razones probablemente estéricas.

En el complejo **1k** el ligando tetrazina, de naturaleza plana, confiere a toda la estructura un carácter completamente rígido, pues no hay en la estructura un enlace que pueda rotar libremente. Las distancias de enlace Ru-N son muy similares a las anteriormente mencionadas para las uniones Ru-bipy y características de un enlace sencillo. De igual manera, las restricciones geométricas impuestas por el ligando cierran el ángulo de enlace N(5)-Ru(1)-N(6) hasta los 79.3°.

En el caso de los compuestos **1l** y **1n** los ligandos que actúan como puente confieren flexibilidad a la estructura dado que no forman anillos quelatos con el metal ya que una de las posiciones está ocupada por ligandos cloro, cuyas distancias son 2.431 y 2.434 Å para **1l** y **1n** respectivamente. La otra posición de coordinación la ocupa un átomo de fósforo del ligando difosfina puente, en el caso del complejo **1n** cuyas distancias de enlace Ru-P son 2.377 y 2.312 Å. En el compuesto **1l** las distancias de enlace Ru-P y Ru-As son de 2.377 Å en ambos casos. En el caso de los compuestos **1l** y **1n** los ángulos de enlace de Cl(1)-Ru(1)-P(1) son 87.50 y 88.54°, respectivamente, siendo más próximos al valor de 90° ideal para una geometría octaédrica.

### 4.2.2. Estudios antiproliferativos *in vitro* en líneas de cáncer humano.

La actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos **1k-1n** y del compuesto de partida *cis*-[Ru(bipy)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> se evaluó en dos líneas de células tumorales humana: el carcinoma de ovario A2780, y el adenocarcinoma de mama MCF7, mediante la aplicación del método MTT, y se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> que se presentan en la Tabla siguiente:

Compuesto	IC <sub>50</sub> $\mu$ M		
	A2780	MCF7	MDAMB231
<i>cis</i> -[Ru(bipy) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	187 $\pm$ 20	233 $\pm$ 64	
<b>1k</b>	7.6 $\pm$ 2.3	30.1 $\pm$ 12.5	
<b>1l</b>	2.2 $\pm$ 0.9	8.5 $\pm$ 2.3	1.7 $\pm$ 0.5
<b>1m</b>	15.3 $\pm$ 7.4	22.7 $\pm$ 6.8	
<b>1n</b>	1.6 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 1.0	7.7 $\pm$ 1.8
<i>cis</i> -platino	2.5 $\pm$ 0.3	23.9 $\pm$ 0.5	

Tabla 10. Datos de IC<sub>50</sub> de los compuestos **1k-1n**, del *cis*-platino y el compuesto de partida *cis*-[Ru(bipy)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> en las líneas celulares A2780 y MCF7.

Todos los compuestos presentan unos valores de citotoxicidad muy buenos frente a ambas líneas (IC<sub>50</sub> < 31  $\mu$ M).

El valor de citotoxicidad más bajo corresponde a los compuestos **1n** y **1l**, con unos valores de IC<sub>50</sub> menores incluso a los que presenta el *cis*-platino (ver tabla 11). Por ello se procedió al análisis de estos compuestos frente a la línea de cáncer de mama triple negativo MDAMB231 que no solo es especialmente agresivo, sino que carece de tratamientos específicos, y por ello tienen menos soluciones farmacológicas y peor

pronóstico<sup>127</sup>. Los resultados indican que la actividad antiproliferativa es alta en ambos casos, con valores de IC<sub>50</sub> de 1.7 y 7.7  $\mu$ M para **1n** y **1l**, respectivamente.

Por otra parte, si hacemos una comparación del comportamiento de estos compuestos dinucleares con los compuestos mononucleares tratados anteriormente en esta memoria, nos permite afirmar que los compuestos dinucleares presentan una actividad citotóxica más alta.

---

<sup>127</sup> P.S. Weisman, C. KY Ng, E. Brogi, R.E. Eisenberg, H.H. Won, S. Piscuoglio, M.R De Filippo, R. Ioris, M. Akram, L. Norton, B. Weigelt, M.F. Berger, J.S Reis-Filho, H. Y Wen. *Mod. Pathol.* **2016**, 29, 476.

### 4.2.3. Interacción con ADN. Espectrofotometría de ultravioleta visible y de dicroísmo circular

#### 4.2.3.1. Ultravioleta visible.

Se estudió la variación de las bandas de absorción de los compuestos **1k-1n** en presencia de diferentes concentraciones de *ct*-ADN por espectroscopia de ultravioleta visible y como resultado se obtuvo que la intensidad de absorción de todos los complejos disminuye (hipocromismo) con el aumento de la concentración de *ct*-ADN, una característica de la intercalación. Además, se observa un cambio batocrómico de todos los compuestos, lo que proporciona una buena evidencia de la intercalación de los compuestos Ru(II) a través del apilamiento e interacción de los anillos aromáticos de los ligandos y los pares de bases de ADN<sup>128</sup>.

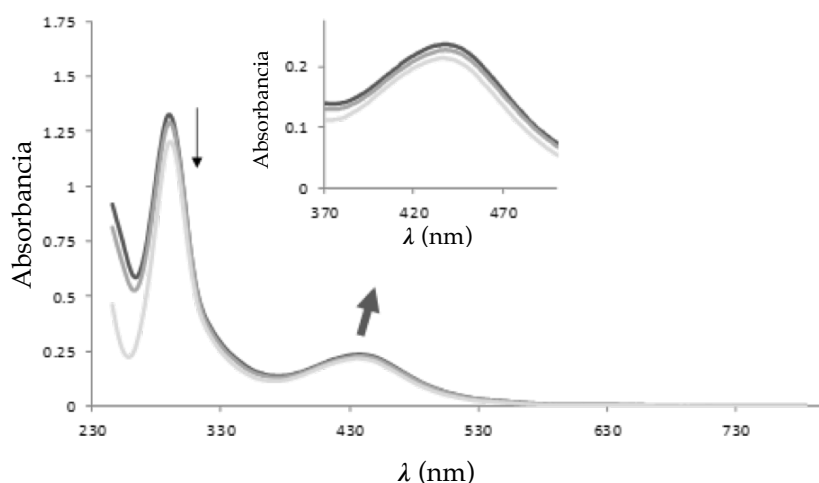


Figura 59. Espectro de absorción de lo compuesto **1n** en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de *ct*-ADN (10, 25 y 50  $\mu$ M). Las flechas indican la disminución en las bandas del espectro (hipocromismo).

<sup>128</sup> B.D. Wang, Z.Y. Yang, P. Crewdson, D.Q. Wang. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, 101, 1492.

En la Tabla 12 se muestra la constante de unión intrínseca  $K_b$ , pudiendo observar que los compuestos **1n** y **1l** muestran mayor afinidad para intercalar que los otros dos compuestos mononucleares estudiados anteriormente, y sus valores son del mismo orden de magnitud de otros complejos de Ru (II) que se unen al ADN a través de intercalación<sup>106, 111</sup>.

Compuesto	Constante de unión, $K_b$ ( $M^{-1}$ )
1k	$4.0 (\pm 0.20) \times 10^4$
1l	$2.2 (\pm 0.20) \times 10^5$
1m	$8.2 (\pm 0.05) \times 10^4$
1n	$2.0 (\pm 0.15) \times 10^5$

Tabla 11. Constante de unión entre los compuestos **1k-1n** y el ct-ADN.

#### 4.2.3.2. Dicroísmo circular.

Se pueden detectar alteraciones conformacionales del ADN inducidas por los compuestos de rutenio de forma un poco más detallada, mediante espectroscopia de dicroísmo circular. En este caso, se estudiaron los compuestos **1n** y **1l**. El espectro obtenido mediante espectroscopia de dicroísmo circular del *ct*-ADN muestra una banda positiva a 286 nm debida al apilamiento de bases y una banda negativa a 246 nm debida a la helicidad.

Los cambios en los espectros de dicroísmo circular observados se presentan en la Figura 60, pueden atribuirse a modificaciones en la estructura de *ct*-DNA, ya que tanto la banda positiva como la negativa del espectro dicroísmo circular se ven afectadas por la presencia del compuesto **1n** y **1l** con el aplanamiento de la banda positiva y una banda negativa más intensa, lo puede indicar que ambos compuestos interaccionan con el ADN mediante intercalación.

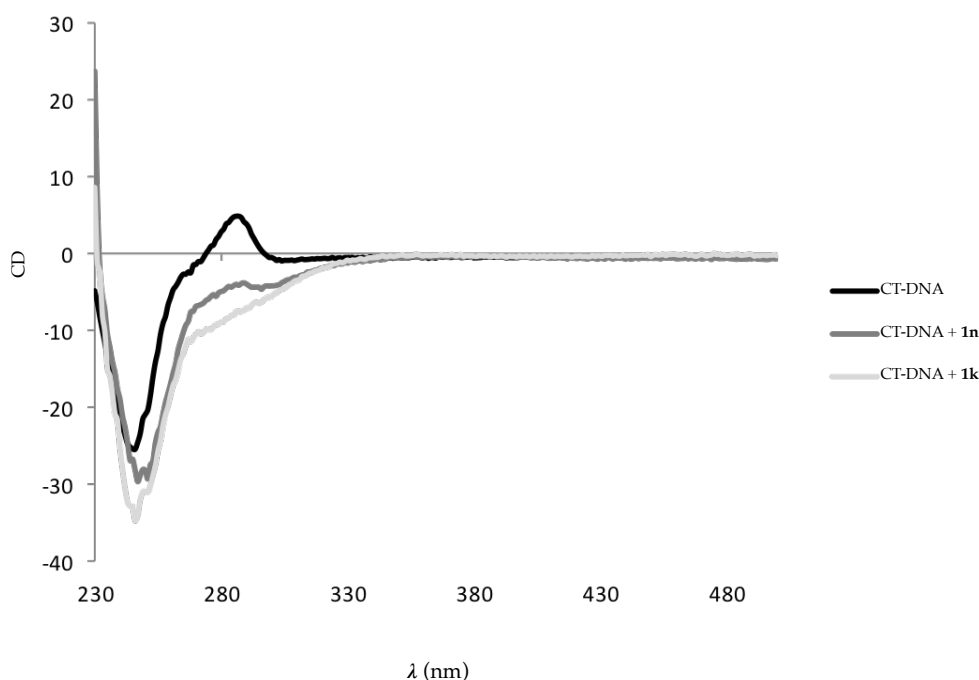


Figura 60. Espectro de dicroísmo circular del *ct*-ADN en presencia de concentraciones crecientes de los complejos **1n** y **1k**, en 10mM Hepes pH 7.4, 1% DMSO a temperatura ambiente. En color negro se presenta el espectro del *ct*-ADN.

#### 4.2.4. Cálculos computacionales de interacción con ADN.

Se llevó a cabo el estudio de acoplamiento entre el ADN y los compuestos **1k-1n** dando como resultado que todos los compuestos interactúan mediante intercalación con el ADN, en concordancia con los resultados obtenidos mediante espectroscopia de ultravioleta visible, y cuyas energías de unión se presentan a continuación.

Compuesto	Docking molecular score (KJ / mol)
<b>1k</b>	-198
<b>1l</b>	-223
<b>1m</b>	-202
<b>1n</b>	-270

Tabla 12. Constante de unión entre los compuestos **1f-1j** y el ct-ADN.

Cabe destacar que, si bien todos los compuestos interactúan mediante la intercalación de un grupo de bipyridina, el compuesto **1m** interactúa a través d un anillo bencílico del ligando difosfina. Por otro lado, cabe destacar que los compuestos **1l** y **1n** tienen tanto las mayores energías de unión obtenidas teóricamente mediante docking, como las constantes de unión mayores calculadas experimentalmente mediante espectroscopia de ultravioleta visible, con valores de  $K_b$  de  $2.2 (\pm 0.20) \times 10^5$  y  $2.0 (\pm 0.15) \times 10^5$  ( $M^{-1}$ ) para **1l** y **1n** respectivamente.



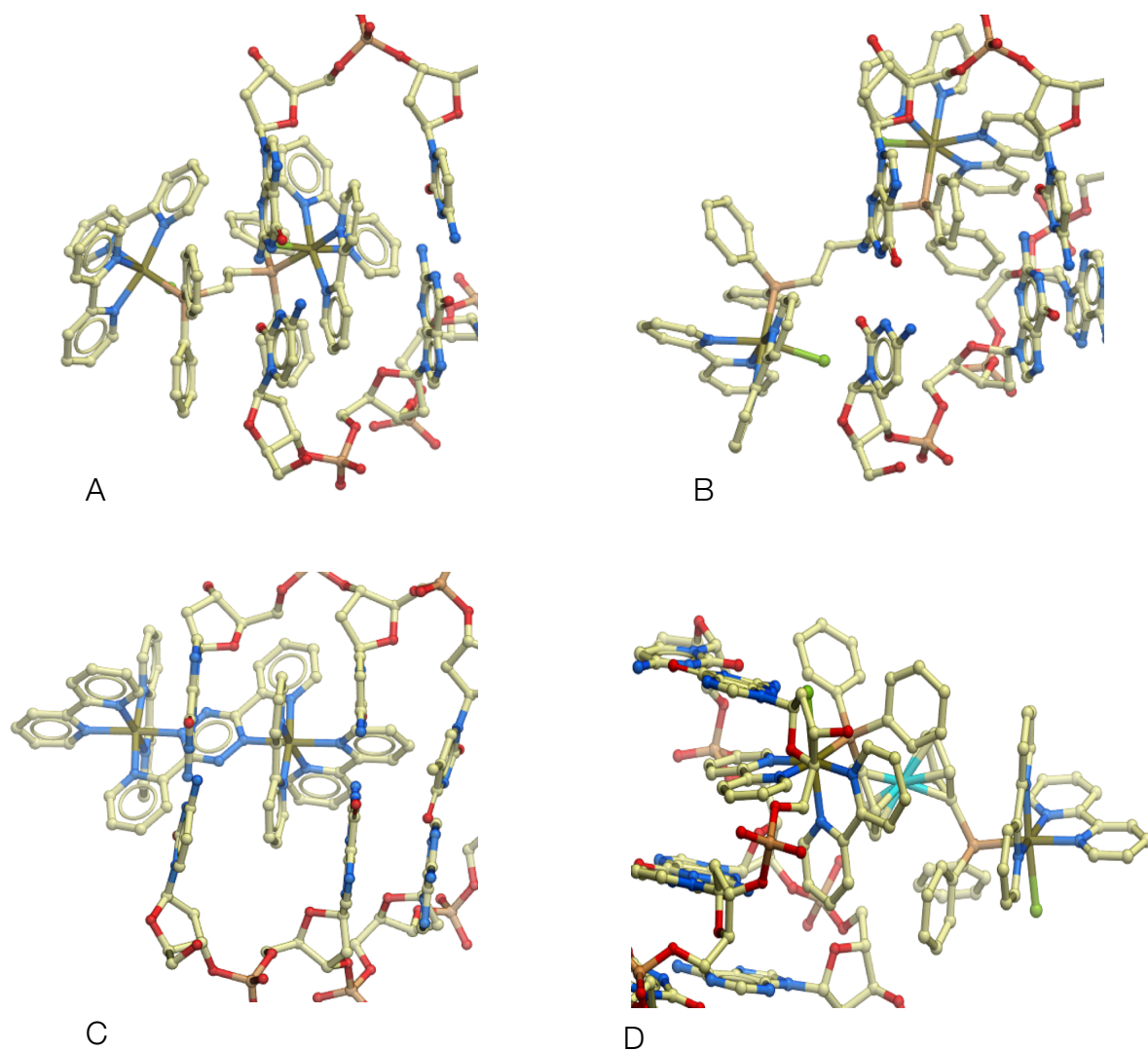


Figura 61. Sección de parte de la estructura ADN-Compuesto resultado de la interacción calculada mediante docking. A: complejo **1l**-ADN, B: complejo **1m**-ADN, C: complejo **1k**-ADN y D: complejo **1n**-ADN. Se ha omitido la cadena completa de ADN para una mejor visualización de la interacción.

#### 4.2.5. Estudios del mecanismo de muerte celular.

Para adquirir mayor información de la forma de actuación de los compuestos **1k-1n** se realizó un estudio de los niveles de apoptosis empleando el método Hoechst sobre la línea celular A2780, y concretamente para los compuestos **1n** y **1l** se realizaron también estudios de la inducción de la apoptosis sobre la línea celular MCF7. Los resultados de ambos estudios se presentan a continuación.

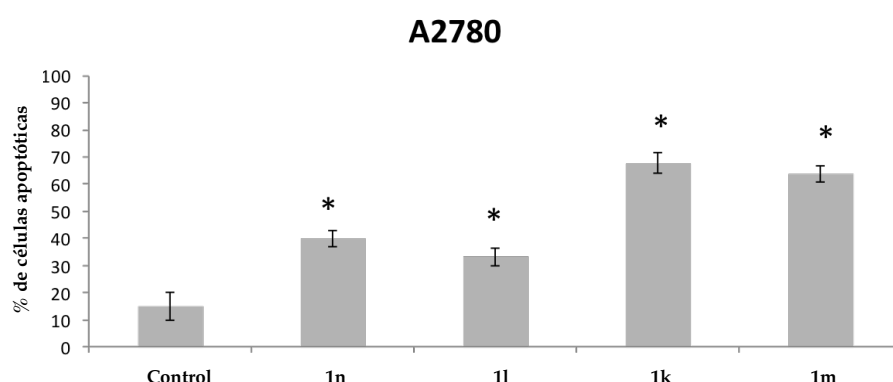
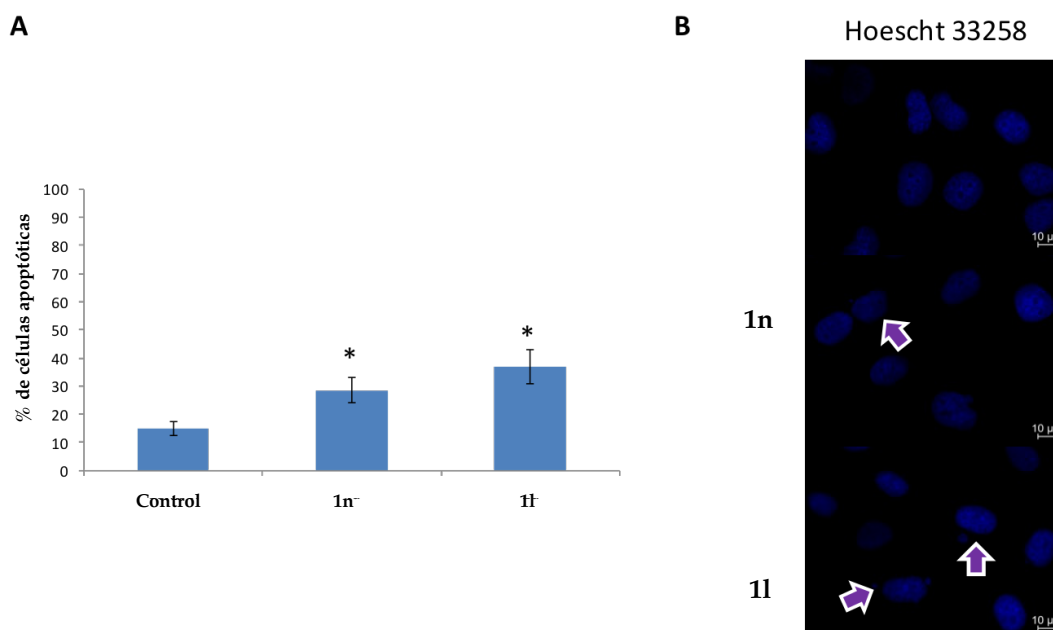


Figura 62. % de células apoptóticas después de la exposición al vehículo control (DMSO) y a los complejos **1k-1n**.

Como se puede observar todos los compuestos inducen muerte celular por apoptosis sobre la línea celular A2780. No obstante, los compuestos **1k** y **1m** inducen un nivel más alto de apoptosis en comparación con los compuestos **1n** y **1l**. Cabe destacar que la evaluación del porcentaje de células apoptóticas inducida por **1n** y **1l** en las células de adenocarcinoma de mama (MCF7) evidenció resultados similares en comparación con los obtenidos sobre la línea A2780.



*Figura 63. A: % de células apoptóticas después de la exposición al vehículo control (DMSO) y a los complejos **1n** y **1l**. B: aumento de los marcadores apoptóticos como la condensación de la cromatina, las anomalías de la estructura nuclear y los cuerpos apoptóticos causados por la exposición de los compuestos **1n** y **1l**.*

En la figura 63 se puede observar un aumento de marcadores apoptóticos, tales como condensación de cromatina, anomalías en la estructura nuclear y cuerpos apoptóticos en células MCF7 incubadas con los compuestos **1n** y **1l**. Sin embargo, el nivel de muerte celular debido a la apoptosis observado en las Figuras 62 y 63 para dichas especies es inferior al esperado teniendo en cuenta los valores de citotoxicidad  $IC_{50}$  en células de cáncer A2780 y MCF7. Por ello es posible que estos compuestos puedan inducir otros tipos de muerte celular programada, como la muerte celular por autofagia.

Empleando DMSO como vehículo control y la rapamicina como control positivo de la autofagia se observa que, mediante el ensayo CYTO-ID y con excepción del compuesto **1k**, los compuestos de Ru indujeron un nivel más alto de autofagia en comparación con la apoptosis en células A2870 expuestas durante 72 horas. Es decir, así como ocurría en el caso de los compuestos mononucleares, los compuestos dinucleares

inducen la muerte celular tanto por apoptosis como por autofagia como ocurre con algunos fármacos anticancerígenos como es el caso del *cis*-platino<sup>129</sup>.

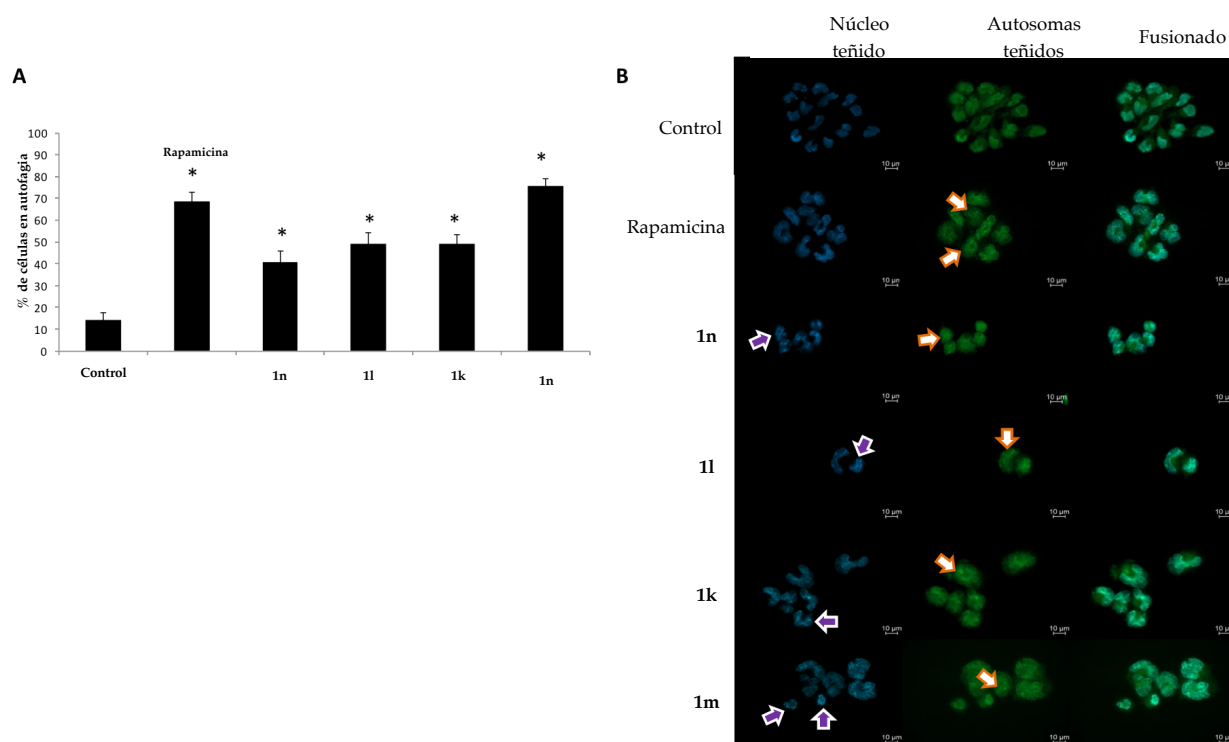


Figura 64. A: % de células autofágicas en presencia de los compuestos **1k-1n**. B: evaluación de la muerte celular autofágica causada por los compuestos **1f-1j** y evaluados por microscopia de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI en azul, y los autofagolisosomas se tiñeron en verde. Las flechas blancas apuntan a la acumulación de autofagolisosomas y las flechas violetas apuntan a las células en la apoptosis.

<sup>129</sup> A) S. Periyasamy-Thandavan, M. Jiang, Q. Wei, R. Smith, X.M. Yin, Z. Dong. *Kidney Int.* **2008**, 74, 631. B) L. Harhaji-Trajkovic, U. Vilimanovich, T. Kravic-Stevovic, V. Bumbasirevic, V. Trajkovic. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, 13, 3644. C) H.S. Kim, J.T. Hwang, H. Yun, S.G. Chi, S.J. Lee, I. Kang, K.S. Yoon, W.J. Choe, S.S. Kim, J.J. Ha. *Biol. Chem.* **2008**, 283, 3731.

#### 4.2.6. Toxicidad *in vivo* en el modelo pez cebra.

Del mismo modo que en el caso de los compuestos de rutenio mononucleares, se utilizaron embriones de pez cebra como modelo de vertebrado de especies para la evaluación de la toxicidad *in vivo* ( $LC_{50}$ ) de los compuestos de rutenio **1k-1n**.

Las concentraciones ensayadas para el experimento final fueron diferentes para cada compuesto dado que, en ensayos preliminares, se obtuvo una respuesta distinta en función del compuesto estudiado. Así, las concentraciones analizadas finalmente fueron para **1k** 10, 20, 30, 40 y 60 mg/L; para **1l** fueron 4, 8, 12, 16 y 20 mg/L; para **1m** fueron 2, 3.5, 5, 6.5 y 8 mg/L; y finalmente, para **1n** fueron 2, 3.5, 5, 6.5 y 8 mg/L (adicionalmente 9.5 y 11 mg / l). El estudio tuvo una duración de 72 h y cada 24 h se evaluó la supervivencia.

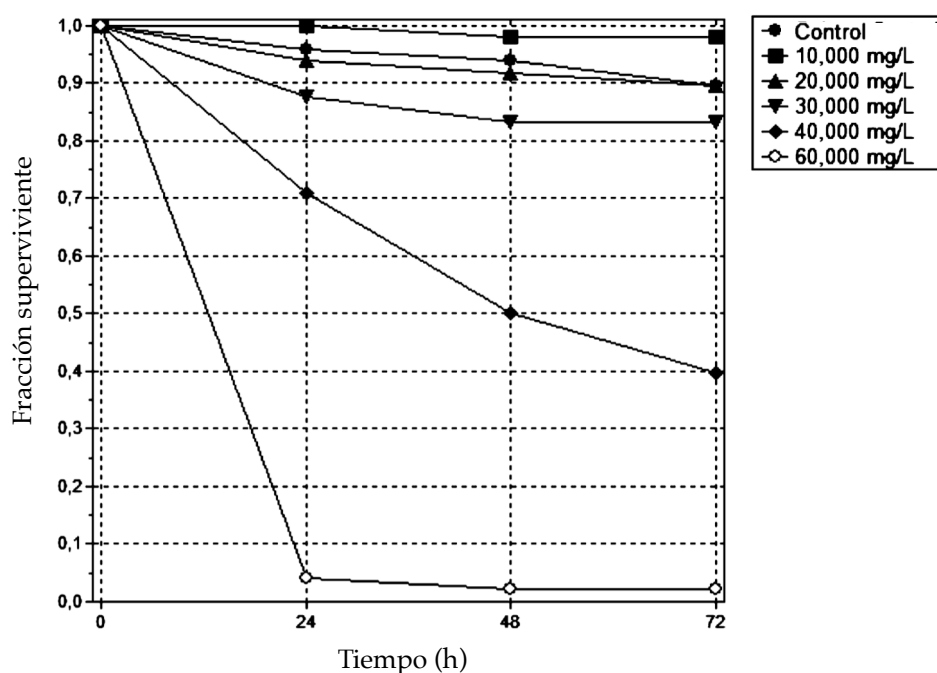


Figura 65 . Gráfico de la supervivencia observada en presencia del compuesto **1k**.

Según los resultados al final del experimento y mediante la curva *dosis-respuesta*, se obtiene el valor  $IC_{50}$ , mientras que los valores de NOEC y LOEC se obtienen a partir de las concentraciones testadas en el experimento.

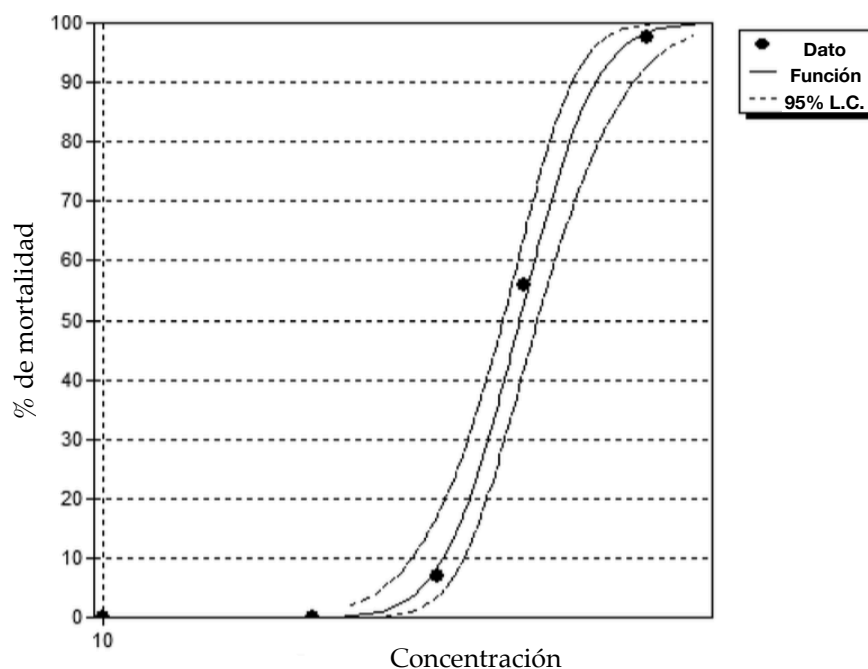


Figura 66 . Curva dosis-respuesta observada en presencia del compuesto **1k**.

Los resultados obtenidos (Tabla 13) indican que el compuesto **1m** es el más tóxico, ( $LC_{50}$  5,397 mg/L, muy comparable al compuesto **1n**, 6,988 mg/L). El compuesto **1k** es, por el contrario, el compuesto menos tóxico (39,404 mg/L) y, con un valor intermedio encuentra el compuesto **1l**, con un  $LC_{50}$  de 15.315 mg/L.

En relación con el tiempo en que el embrión sale del corion (barrera protectora externa que aparece usualmente entre 48 y 72 hpf), se observa que en el caso de los compuestos **1l** y **1m** se provoca un retraso en este proceso en concentraciones intermedias (8 y 12 mg/L para **1l** y 3,5 y 5 mg/L para **1m**), ya que las concentraciones más altas (16 y 20 mg/L para **1l** y 8 mg/L para **1m**) causan la muerte de una gran proporción de embriones. Sin embargo a concentraciones más bajas (4 mg/L para **1m** y 2 mg/L para **1l**) los compuestos no tienen ningún efecto. Por otra parte su parte, en el caso de los compuestos **1k** y **1n** se aprecia que no influyen sobre el tiempo en que los embriones salieron del corion.

Teniendo en cuenta los resultados de los análisis *in vivo*, el compuesto **1k** es el compuesto más seguro desde el punto de vista del estudio de toxicidad *in vivo* y parece el más prometedor para futuros ensayos.

Compuesto	LC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	NOEC (mg L <sup>-1</sup> )	LOEC (mg L <sup>-1</sup> )
1k	39.404	30.00	40.00
1l	15.315	8.00	12.00
1m	5.397	2.00	3.50
1n	6.988	3.50	5.00

Tabla 13. Toxicidad in vivo en el modelo de pez cebra de los compuestos **1k-1n**.

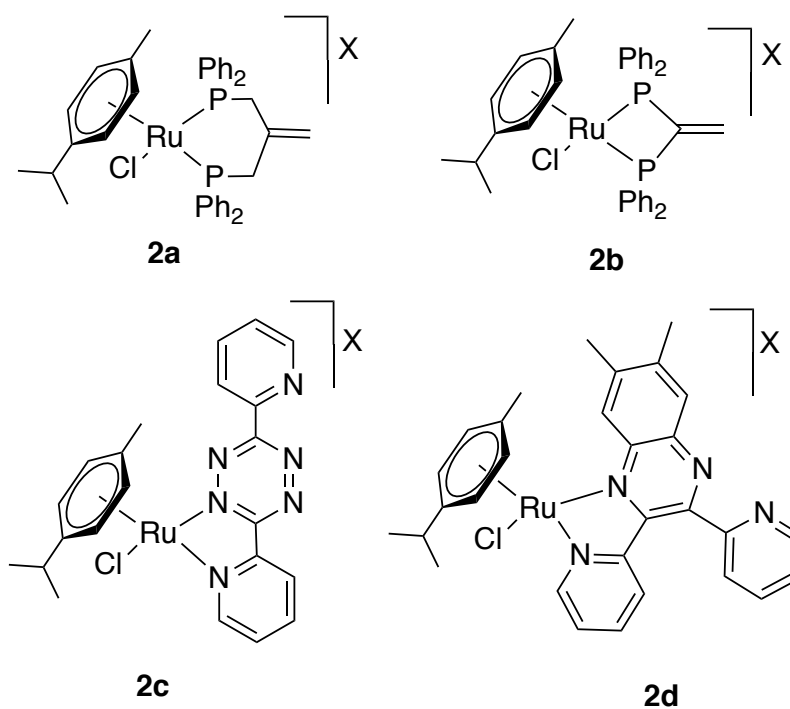




### 4.3. Compuestos mononucleares de rutenio derivados de paracimeno.

#### 4.3.1. Determinación estructural.

El tratamiento del complejo precursor de rutenio tetraclorobis(*p*-cimeno)dirutenio(II) con trifluorometanosulfonato de plata en diclorometano seco, y posterior reacción con los ligandos bidentados apropiados P,P y N,N en la relación molar 1:2, conduce a la obtención de los compuestos **2a-2d**, que se aislaron como sólidos estables con rendimientos en el intervalo 83-90%, para los que se han propuesto las siguientes estructuras mononucleares en las que los ligandos bidentados P,P y N,N actúan como ligandos quelato.



**2a-2d:** X = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>

Los datos de análisis elemental son coherentes con una formulación  $[\text{Ru}(p\text{-Cy})_2\text{Cl}(\text{L})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$  ( $\text{L}$  = ligando bidentado P,P o N,N;  $\text{X} = \text{CF}_3\text{SO}_3$ ).

Las medidas de conductividad realizadas empleando una concentración  $10^{-3}$  M en etanol indican en todos los casos que se trata de electrolitos 1:1, y son coherentes con la formulación planteada sobre la base de que dichas especies están formadas por un catión complejo de Ru(II) y un contraión triflato.

Los espectros de masas (FAB) presentan en la mayoría de los casos, con una intensidad relativamente alta, el pico correspondiente al fragmento resultante de la pérdida del contraion triflato,  $[\text{Ru}(p\text{-Cy})_2\text{Cl}(\text{Ligando})]^+$

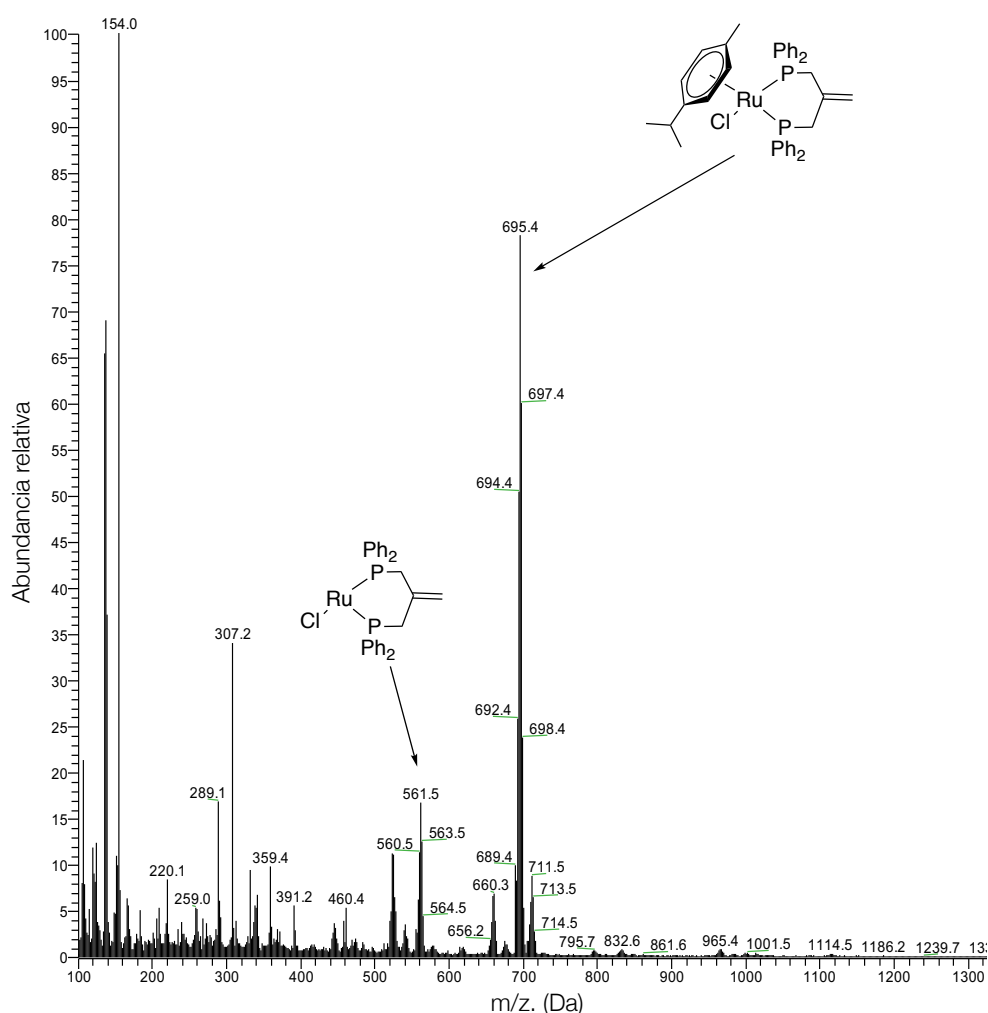


Figura 67. Espectro de masas del compuesto 2a.

En la espectroscopia infrarroja, se observan cuatro bandas intensas asignadas a las vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos  $\text{CF}_3$  y  $\text{SO}_3$  del ligando triflato, entre  $1270$  y  $1030\text{ cm}^{-1}$ , actuando como contraíón. También se distinguen de manera cualitativa, las bandas de vibración atribuibles al fragmento de *p*-cimenó, en cuanto a los enlaces C-H, registradas *ca.*  $2900\text{ cm}^{-1}$ .

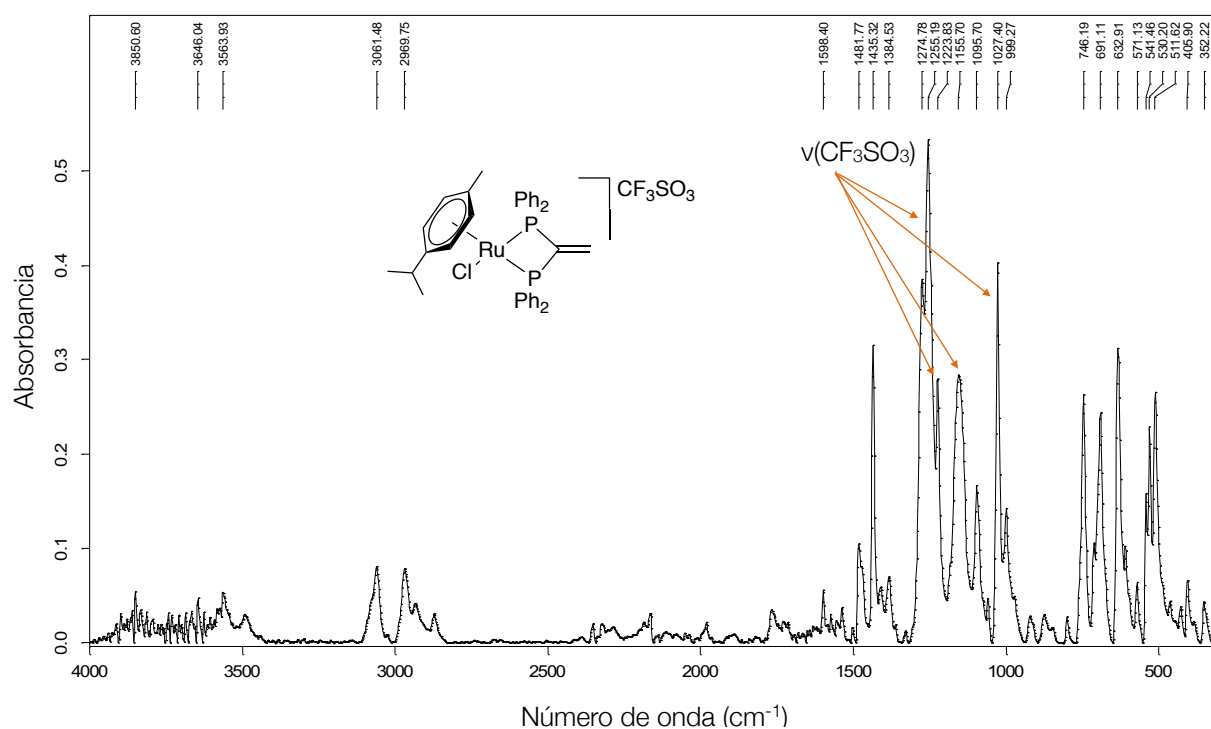


Figura 68. Espectro de IR del compuesto **2b**.

A diferencia de los anteriores compuestos de rutenio ya discutidos, que presentaban en su estructura ligandos bipyridina, los espectros de RMN de protón de estas especies derivadas de *p*-cimenó resultan sencillos a la hora de interpretar. En estas especies, dependiendo del ligando quelato coordinado al metal, en concreto de su naturaleza simétrica o asimétrica, se pueden observar diferencias significativas para las señales correspondientes al fragmento *p*-cimenó.

En el caso de los complejos **2a** y **2b**, en los que los ligandos fosfina que tienen una estructura simétrica, las señales de los hidrógenos fenílicos del *p*-cimenó se muestran

como dos dobletes a 6.02 y 5.90 ppm en el compuesto **2a** y a 5.90 y 5.57 ppm para el compuesto **2b**. Además, se registran 3 señales adicionales de dicho fragmento: un doblete *ca.* 1.00 ppm asignados a la resonancia de los metilos CHMe<sub>2</sub> (Me<sub>c</sub>, Me<sub>b</sub>), un singlete asignado a la resonancia del otro grupo metilo *ca.* 1.60 (Me<sub>a</sub>) y una señal multiplete *ca.* 2.30 que corresponde con la resonancia de CHMe<sub>2</sub> (H<sub>c</sub>).

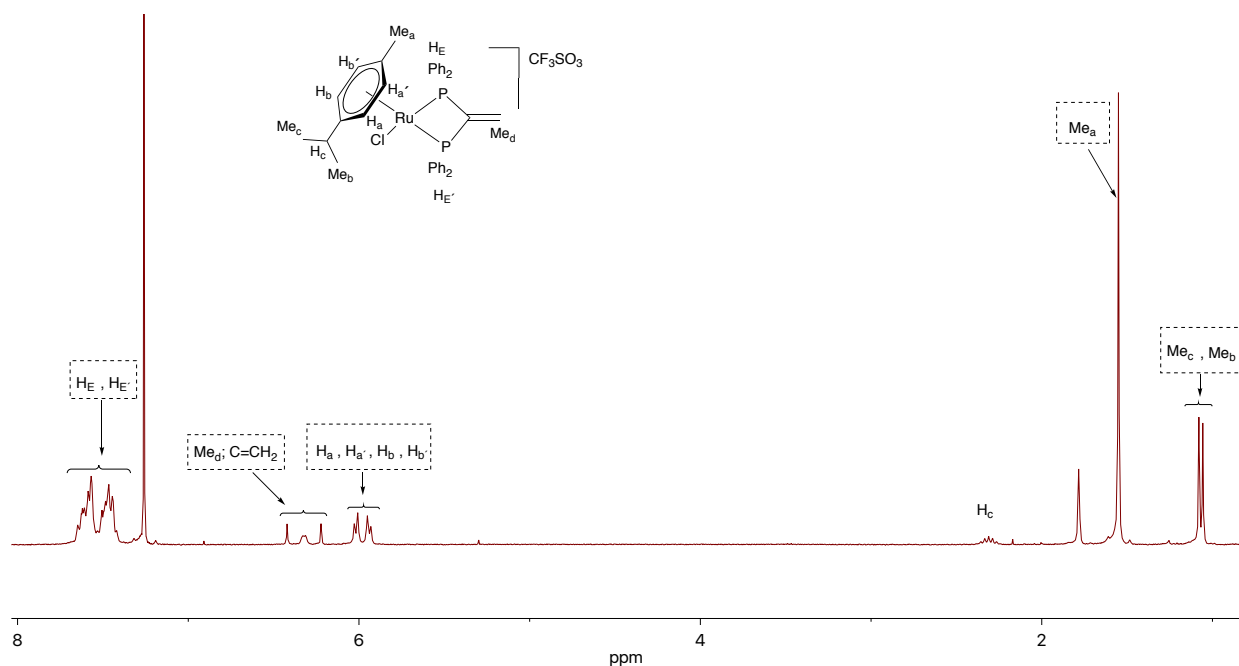


Figura 69. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del complejo **2b**.

Para los complejos **2c** y **2d**, con ligandos quelatantes N,N, las señales del metilo terminal y las de grupo isopropilo del resto *p*-cimeno no variaron considerablemente con respecto a los compuestos **2a** y **2b**. Sin embargo, dada la naturaleza asimétrica de los ligandos bidentados N,N, las señales de los protones fenílicos del *p*-cimeno se desdoblan, mostrándose cuatro señales dobletes en el compuesto **2c** (a 6.29, 6.23, 6.13 y 6.05 ppm), y tres señales doblete en el compuesto **2d** (a 6.40, 6.24 y 6.10 ppm, una de ellas integrando por dos H). En los dos casos, las señales de los protones piridínicos de los ligandos se registran en la zona aromática en el intervalo 9.57-7.29 ppm pudiendo ser asignadas inequívocamente alguna de ellas. Por ejemplo, las señales a 9.50 ppm en el compuesto **2c** y a 9.54 ppm en el complejo **2d** corresponden con las señales del protón

adyacente al nitrógeno coordinado al rutenio. En el caso del compuesto **2d**, dos singlets a 8.67 y 8.14 ppm se asignan a los átomos de hidrógeno del anillo fenílico del ligando (en la figura 70,  $H_d$  y  $H_{d'}$ ) y dos singlets a 2.75 y 2.78 ppm a los grupos metilos (en la figura 70,  $Me_d$  y  $Me_e$ ).

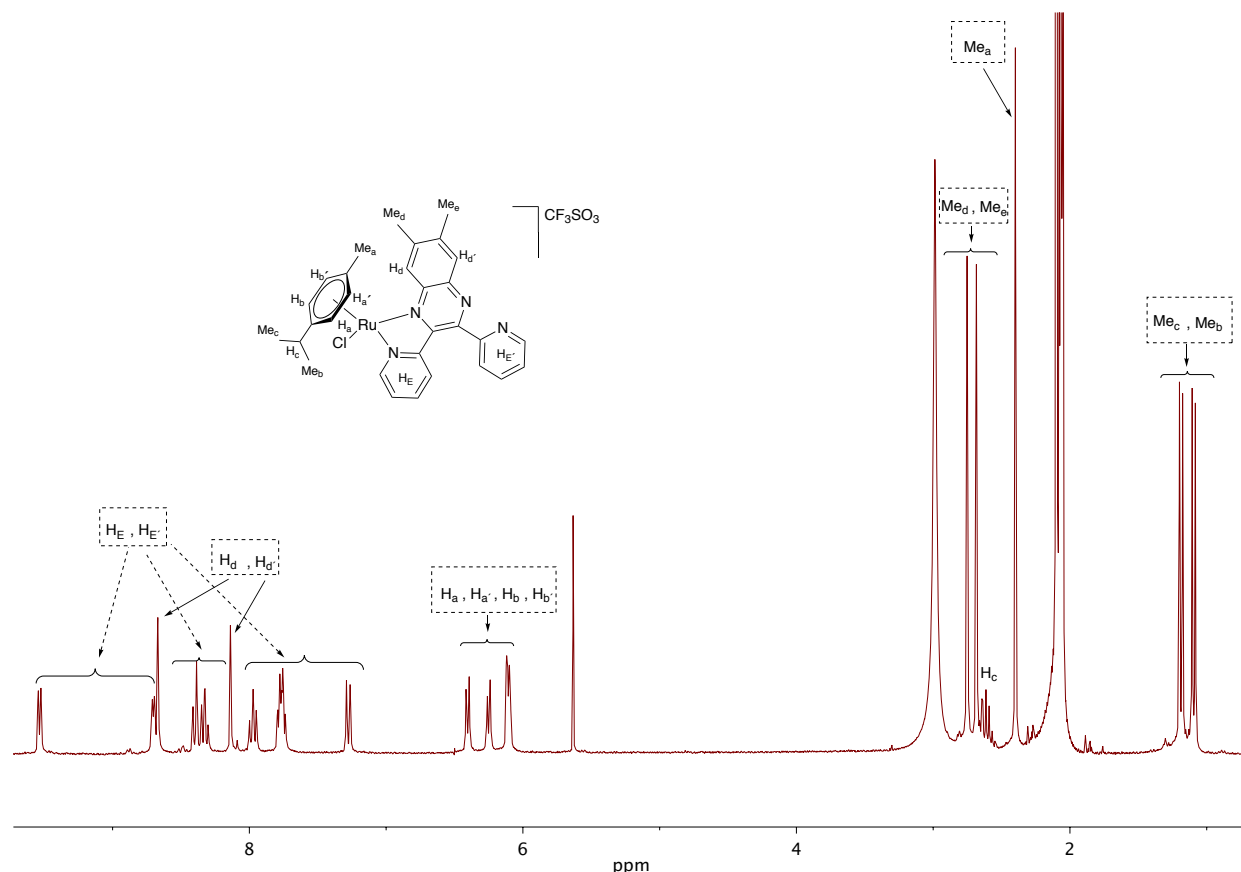


Figura 70. Espectro de RMN  $^1H$  del complejo **2d**.

En el caso particular de los complejos **2a** y **2b**, los espectros de RMN  $^{31}P\{-^1H\}$  mostraron un singlete a 28.8 y 20.5 ppm respectivamente, desplazado a campo bajo con respecto a la señal de la correspondiente difosfina libre, lo que nos indica que ambos átomos de fósforo están coordinados y son equivalentes.

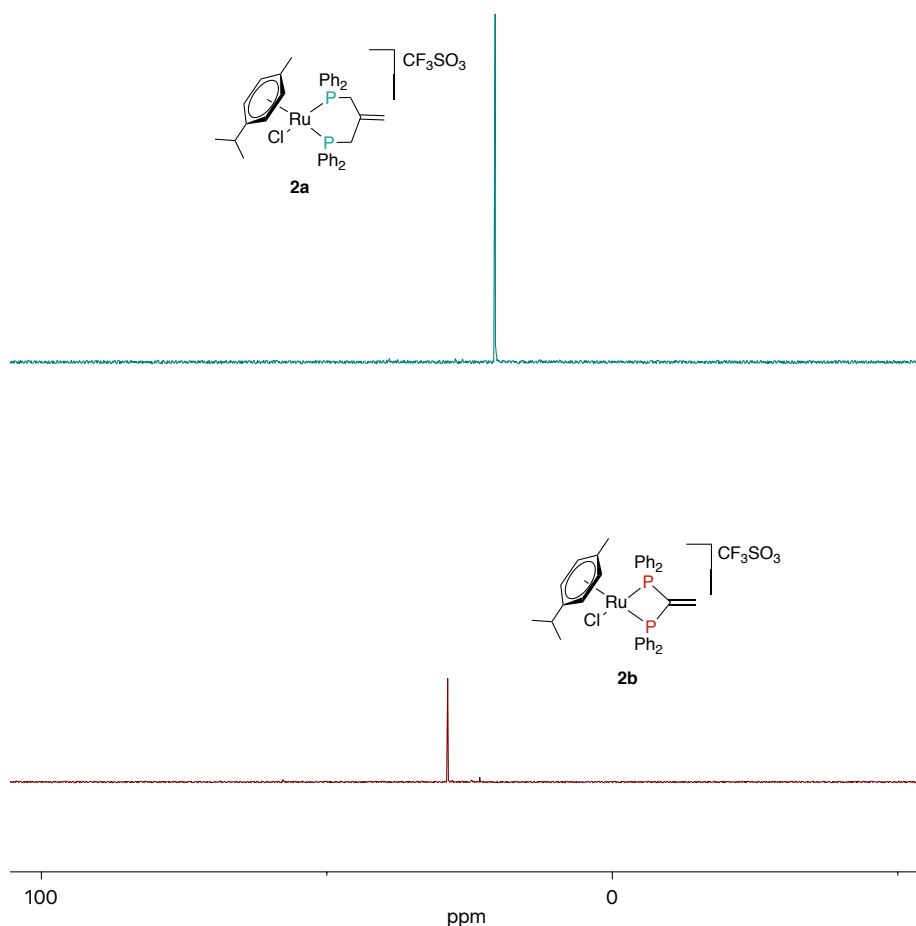


Figura 71. Superposición de los espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$  de los compuestos **2a** y **2b**.

La resolución por difracción de RX de la estructura cristalina de los compuestos **2a**, **2b** y **2d** confirma la estructura propuesta a partir de los datos espectroscópicos. Los monocristales de estas especies han sido obtenidos mediante difusión lenta de *n*-hexano sobre una disolución de diclorometano de los correspondientes complejos. Los datos cristalográficos significativos se dan en las Tablas 21 y 22 del Anexo I y una selección de distancias y ángulos de enlace en la Tabla 26 del Anexo II.

Los cristales contienen, por unidad asimétrica, un catión molecular, un contraión de trifluorometanosulfonato y una molécula de diclorometano para el compuesto **2a** y media molécula de agua para el compuesto **2b**, y dado que los compuestos cristalizan en grupos espaciales centrosimétricos, en el cristal del compuesto **2d** están presentes ambos enantiómeros.

En los cationes complejos el átomo de rutenio(II) presentan una geometría pseudotetraédrica típica de los compuestos semi-sandwich derivados de rutenio (también denominados estructura de taburete de piano), y está unido a tres ligandos: el ligando cloro y el otro es el fragmento  $\eta^6$ -*p*-cimeno, ambos están presentes en todas las estructuras. El tercer ligando quelatante varía: para el compuesto **2a** es (2-metilenopropano-1,3-diil)bis(difenilfosfina), para el compuesto **2b** 1,1-bis(difenilfosfino)eteno y para el compuesto **2d** 6,7-dimetil-2,3-di(piridin-2-il)quinoxalina.

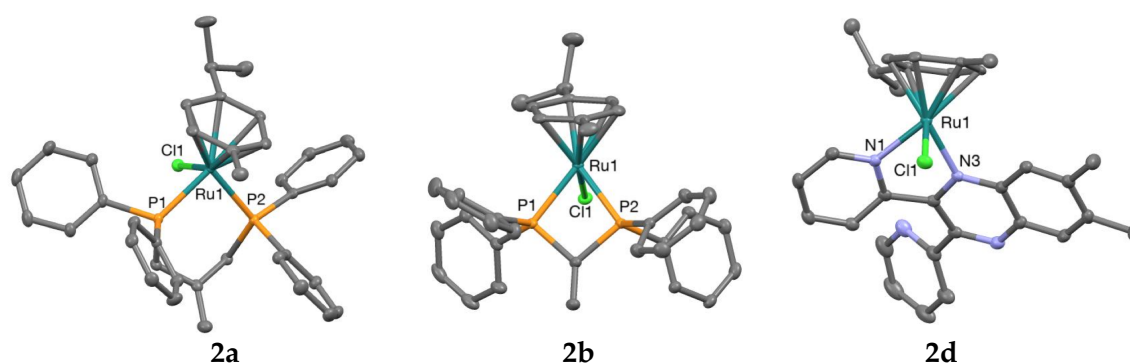


Figura 72. Estructura cristalina del catión molecular de los compuestos **2a**, **2b** y **2d**.

En los tres complejos, el plano de coordinación [P(1)-Ru(1)-P(2) ó N(1)-Ru(1)-N(3)] forma un ángulo con el anillo aromático *p*-cimeno entre 55 y 63°, con el fin de aliviar los impedimentos estéricos.

En los complejos **2b** y **2d**, los anillos quelato de cuatro y cinco miembros formados por los ligandos fosfina y quinoxalina, respectivamente, son prácticamente planos. Sin embargo, el quelato de seis miembros del complejo **2a** muestra una conformación bote con el metal y los átomos de carbono C(2) por encima del plano formado por los átomos P(1), P(2), C(1) y C(3).

Debido a la mayor tensión del anillo quelato de cuatro miembros presente en el complejo **2b**, el ángulo de enlace P(1)-Ru(1)-P(2) tiene un valor de 72.4°. En contrapartida, en el caso del complejo **2a**, con un anillo quelato de 6 miembros, dicho ángulo

es considerablemente mayor,  $90.6^\circ$ . Sin embargo, las distancias de enlace Ru-P son casi idénticas en todos los complejos, con valores dentro del intervalo de 2,311-2,329 Å. Las distancias de los enlaces Ru(1)-Cl(1) son similares en los tres complejos [2,3857 (7), 2,3876 (9) y 2,3959 (18) Å para **2a**, **2b** y **2d** respectivamente]. Todas las longitudes y ángulos de enlace están de acuerdo con los valores previamente indicados para complejos similares.

Los complejos **2a-2d** se estudiaron por voltametría cíclica y los datos más relevantes se presentan en las Tablas 30 y 31 del anexo III.

Los complejos **2a** y **2b** en acetonitrilo, al escanear hacia los potenciales positivos presentan una oxidación asociada al proceso Ru(II)/Ru(III). En el escaneo de retorno, se observa a un proceso cuasi-reversible Ru(II)/Ru(III) con  $E_{1/2} = 1.705$  V para el complejo **2a** y, para el complejo **2b**, el proceso se vuelve irreversible ( $E_{pa} = 1.67$  V). Este comportamiento indica que en este caso del compuesto **2b** la especie con Ru(III) no es estable.

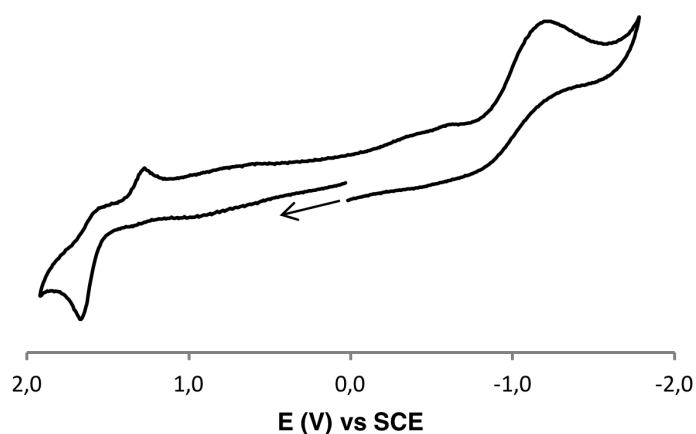


Figura 73. Voltamograma del complejo **2b** en acetonitrilo.

El centro metálico de Ru(II) en el complejo **2b** se oxida más fácilmente que el compuesto **2a**, lo que indica que el ligando del compuesto **2b** es mejor donador de



electrones que el ligando del compuesto **2a**. Además, ambas especies muestran procesos de reducción irreversibles asignados a procesos centrados en los ligandos.

En diclorometano, el comportamiento redox del complejo **2a** mostró un proceso de oxidación centrado en el átomo de Ru(II) con un valor de potencial de 2.0 V. El complejo también muestra un pico de adsorción a 0.19 V y un proceso de reducción irreversible atribuido al ligando a -1.04 V. El complejo **2b** mostró un comportamiento similar, mostrando un proceso de oxidación para el centro de Ru(II) a 1.6 V y una reducción irreversible a -1.3 V.

Con respecto a los compuestos de rutenio que contienen ligandos heterocíclicos, el complejo **2c**, en acetonitrilo, mostró un pequeño proceso redox cuasi-reversible en el intervalo de potencial positivo ( $E_{1/2} = 0.595\text{V}$ ), que puede atribuirse a la oxidación Ru(II)/Ru(III). En el rango de potenciales negativos se encontró también un proceso redox cuasi-reversible ( $E_{1/2} = -1.295\text{V}$ ) centrado en el ligando. También se hicieron intentos para comprobar la respuesta del complejo **2c** en diclorometano, sin embargo, no se detectaron ondas significativas dentro de los límites de la ventana de trabajo.

El comportamiento redox del complejo **2d**, en acetonitrilo, se caracteriza por un proceso de oxidación irreversible a 1.86 V, atribuido al proceso Ru(II)/Ru(III). El complejo, además, muestra un proceso de reducción irreversible centrado en el ligando a -0.68 V.

Dados los resultados para los potenciales Ru(II)/Ru(III) apreciablemente altos, así como la naturaleza irreversible de los procesos de oxidación, las especies de rutenio(III) son inestables, es decir, los ligandos alrededor del metal permiten estabilizar el estado de rutenio(II).

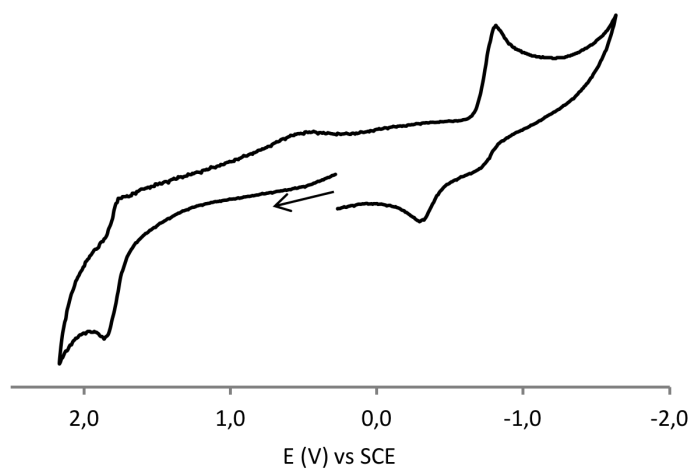


Figura 74. Voltamograma del complejo **2d** en diclorometano.

### 4.3.2. Estudios antiproliferativos *in vitro* en líneas de cáncer humano.

Se ha llevado a cabo la evaluación de la citotoxicidad por un lado de los compuestos preparados y, por otro, de los ligandos fosfinas y heterocíclicos utilizados en la síntesis de los mismos, observándose que los ligandos presentan, en el mismo rango de concentración, unos datos de citotoxicidad muy baja ( $IC_{50} > 100$ ), mientras que la coordinación de dichos ligandos al fragmento  $Ru(p\text{-cimen})Cl$  conduce a unas propiedades antiproliferativas acusadas.

Los complejos **2a** y **2b**, que incorporan ligandos fosfina en su estructura son mucho más activos, al menos un orden de magnitud que los complejos **2c** y **2d** con los ligandos heterocíclicos, tal y como se puede apreciar en la Tabla 15.

Con respecto a los compuestos **2a** y **2b**, que se diferencian únicamente en el tamaño del anillo quelato formado al coordinarse la fosfina con el rutenio, de 6 y 4 miembros respectivamente, los resultados indican que para todas las líneas testadas el compuesto **2a** ofrece mejores resultados de actividad. Dicho complejo presenta incluso una citotoxicidad notable para las células de mama triple negativas MDAMB231 conocidas por ser un tipo de cáncer de mama agresivo.

En el caso de los compuestos **2c** y **2d** existe una gran diferencia entre sus actividades, siendo el compuesto **2d** el más activo en todas las líneas estudiadas.

Compuesto	IC <sub>50</sub> $\mu$ M		
	A2780	MCF7	MDAMB231
2a	0.32 $\pm$ 0.17	0.19 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.21
2b	1.87 $\pm$ 0.59	1.54 $\pm$ 0.50	2.56 $\pm$ 0.75
2c	33.3 $\pm$ 13.3	43.4 $\pm$ 12.0	84.8 $\pm$ 25.5
2d	5.02 $\pm$ 1.2	1.77 $\pm$ 0.15	8.05 $\pm$ 5.35

Tabla 15. Datos de  $IC_{50}$  de los compuestos **2a-2b**.



### 4.3.3. Estudio de interacción con albúmina por fluorescencia.

La albúmina de suero humano (HSA) es la proteína plasmática más abundante en la sangre con una concentración de 0,6 mM y es, sin duda, una de las proteínas más importantes ya que no sólo se encuentra en la sangre sino también en otros compartimentos extravasculares<sup>130</sup>. Además, es la proteína de transporte inespecífica más importante en el sistema circulatorio por lo que su papel en la distribución de fármacos es crucial<sup>131</sup>.

Se han desarrollado compuestos afines a la albúmina, sobre todo en el campo de la quimioterapia para mejorar las propiedades de los medicamentos contra el cáncer<sup>132,133</sup>. La vinculación de los medicamentos quimioterapéuticos a un sistema de transporte macromolecular puede mejorar la focalización, reducir la toxicidad y superar los mecanismos de resistencia a los medicamentos debido a que la HSA en particular es utilizada, entre otras cosas, en el proceso de proliferación por las células tumorales como fuente de nitrógeno y energía<sup>134</sup>. Este hecho proporciona un gran estímulo para la elección de la albúmina como transportador de fármacos en el organismo.

La HSA tiene un solo residuo de triptófano, Trp 214, que se puede excitar selectivamente a 295 nm, y la emisión correspondiente se puede observar cerca de los 330 nm. El Trp 214 es muy sensible a su entorno y puede detectar incluso cambios menores que se producen debido a la unión de fármacos o debido a las alteraciones estructurales de la proteína<sup>135</sup>.

---

<sup>130</sup> J.P. Nicholcosn, M.R. Wolmarans, G.R. *Br. J. Anaesth.* **2000**, 85, 599.

<sup>131</sup> S. Natelson, E. A. Natelson, *Principles of Applied Clinical Chemistry: Chemical Background and Medical applications*, **2012**, Springer-Verlag, New York (United States).

<sup>132</sup> G. Stehle, A. Wunder, H.H. Schrenk, G. Hartung, D.L. Heene, H. Sinn. *Anticancer Drugs*. **1999**, 10, 785.

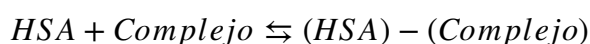
<sup>133</sup> F. Kratz, R. Muller-Driver, I. Hofmann, J. Dreves, C. Unger. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1253.

<sup>134</sup> Shawn M. Davidson. *Nature Letters*. **2013**, 497, 633.

<sup>135</sup> A) G. Colmenarejo. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23, 275. B). Demoro, R.F.M. de Almeida, F. Marques, C.P. Matos, L. Otero, J. Costa Pessoa, I. Santos, A. Rodríguez, V. Moreno, J. Lorenzo, D. Gambino, A.I. Tomaz. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 7131.

Dado que los compuestos **2a** y **2b** son muy poco solubles en medios acuosos se realizó el estudio de interacción con la albúmina solamente con los compuestos **2c** y **2d** mediante espectroscopia de fluorescencia, dando como resultado que los complejos provocan una disminución en la intensidad de emisión de la proteína con una concentración creciente de cualquiera de los complejos, alcanzando aproximadamente el 40% y el 51% de la intensidad inicial para **2c** y **2d**, respectivamente.

Para ambos complejos, la variación de  $I_{F_0}/I_F$  con el aumento de la concentración de compuesto se ajusta bien a una tendencia lineal. Esta linealidad (y el hecho de que los espectros de emisión normalizados para todas las concentraciones ensayadas no mostraron ningún cambio en el valor de longitud de onda de emisión máxima  $\lambda_{emmax}$ ) sugiere que el proceso de extinción de fluorescencia se lleva a cabo por una desactivación estática. En tal caso, esto sería consistente con la formación de un aducto no fluorescente con una constante de unión  $K_b$  correspondiente a la asociación del inactivador, en este caso los compuestos **2c** y **2d** con el fluoróforo<sup>136</sup> según el equilibrio:



Mediante la ecuación de Stern- Volmer,

$$I_{F_0}/I_F = 1 + K_{sv}C_{complejo}$$

donde  $I_{F_0}$  y  $I_F$  es la intensidad de emisión del fluoróforo en ausencia y en presencia de compuesto) se puede interpretar la constante  $K_{sv}$  como una constante de unión  $K_b$  obtenida como resultado del ajuste lineal de los datos para **2c** y **2d** cuyo valor de constante es  $\text{Log } K_{SV} = (5,18 \pm 0,04)$  y  $\text{Log } K_{SV} = (4,88 \pm 0,05)$ , respectivamente.

<sup>136</sup> B. Valeur, Fluorescence Molecular: Principles and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, Weinheim (Germany).

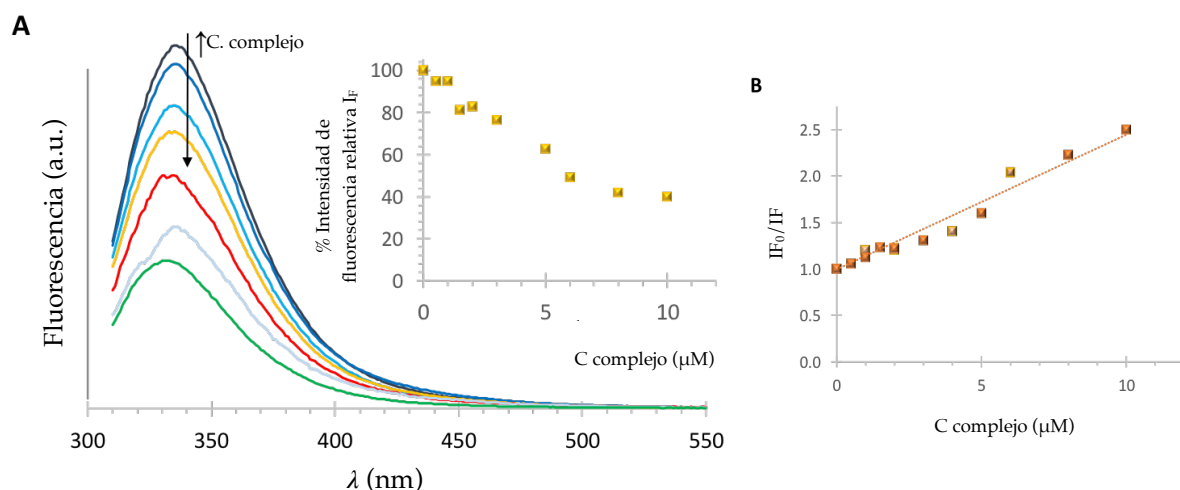


Figura 75. Representación gráfica de los datos de emisión resultado de la interacción entre el compuesto **2c** y la HSA. A). La línea negra HSA se corresponde con el espectro de la HSA sola, y las líneas coloreadas se corresponden con la concentración creciente del compuesto. B) Ajuste de los datos obtenidos en el experimento.

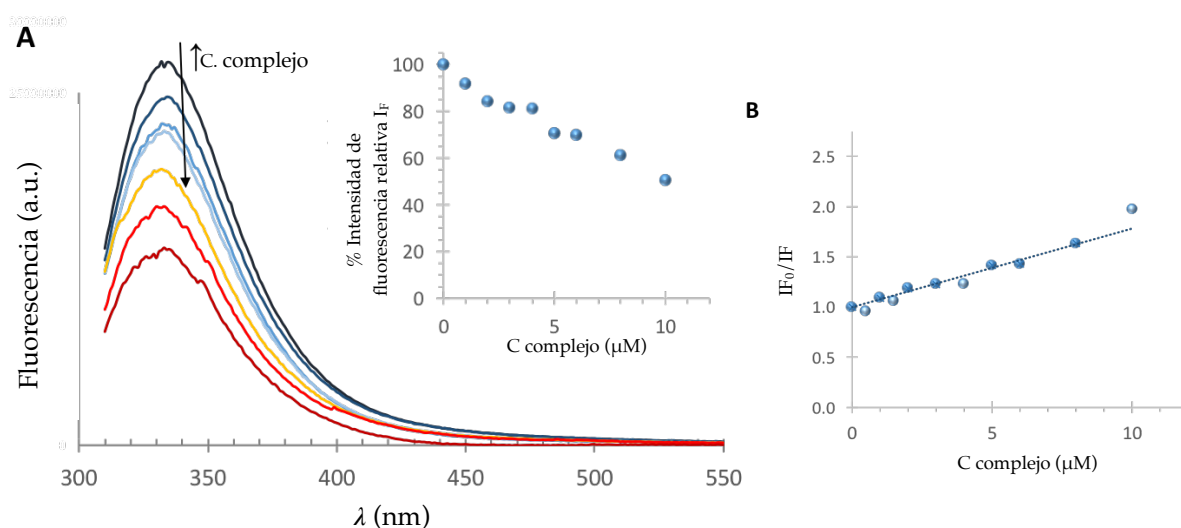


Figura 76. Representación gráfica de los datos de emisión resultado de la interacción entre el compuesto **2d** y la HSA. A). La línea negra HSA se corresponde con el espectro de la HSA sola, y las líneas coloreadas se corresponden con la concentración creciente del compuesto. B) Ajuste de los datos obtenidos en el experimento.

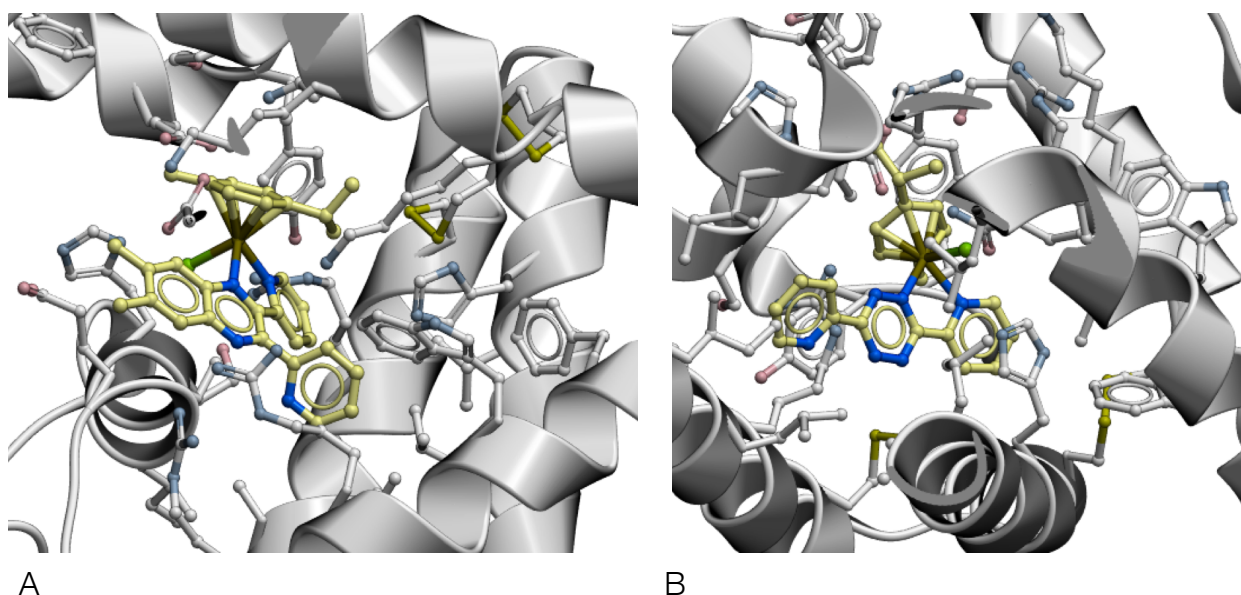
Los resultados indudablemente indican que existe una interacción moderada-fuerte entre ambos complejos y la HSA que afecta significativamente la fluorescencia del Trp 214, lo que indica que ambos compuesto interactúan con la HSA a través del sitio 1. Por lo tanto la HSA es posiblemente el vehículo de transporte de este tipo de compuestos *in vivo*, lo que pudiera también añadir mayor especificidad hacia las células cancerígenas debido a que éstas toman HSA en una tasa mayor que una célula normal.



#### 4.3.4. Estudio teórico de interacción con albúmina.

El empleo de sondas moleculares fluorescentes permiten identificar dos sitios de unión denominados en la literatura como el sitio 1, localizado en el subdominio IIA y el sitio 2, en subdominio IIIA. Generalmente las sustancias que se unen a la HSA se alojan principalmente a uno de los dos sitios de unión, mediante interacciones que dan como resultado constantes de asociación cuyo valores oscilan entre  $10^4$  y  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . El sitio 1, también llamado sitio de la warfarina, tiene gran volumen y se caracteriza por tener una mayor flexibilidad. en comparación con el sitio II. Los aminoácidos que tienen mayor relevancia para la interacción con fármacos son la Arg 218 y, sobre todo, Trp 214, dada su fluorescencia intrínseca que permite mediante espectroscopia de fluorescencia estudiar la interacción entre un compuesto con la HSA.

Para llevar a cabo el estudio de acoplamiento se empleó la estructura cristalográfica 1e71 obtenida de la base de datos *Protein Data Bank*. Con respecto a los compuestos se utilizó para el compuesto **2d** la estructura cristalina obtenida mediante difracción de rayos x de monocristal, mientras que para el compuesto **2c** se empleó la estructura obtenida mediante cálculos teóricos.



*Figura 77. Estructuras HSA-Compuesto resultado de la interacción calculada mediante docking. A: complejo 2d-HSA, B: complejo 2c-HSA.*

Los resultados obtenidos del estudio de acoplamiento de ambos compuestos con la albúmina a través del sitio 1, en donde se encuentra presente el triptófano 214, (figura 77), presentan las energías de unión que se muestran en la siguiente tabla. La energía liberada en ambos procesos indica que la interacción proteína-compuesto es un proceso favorable.

Compuesto	Docking molecular score (KJ / mol)
2c	-143
2d	-137

*Tabla 15. Energía de unión de los compuestos 2c y 2d con la HSA.*

Aunque no se observa una gran diferencia entre los valores energéticos debidos a la interacción de los compuestos con la proteína, dicha diferencia podría deberse a que en el caso del compuesto **2c** se produce una interacción entre el anillo de piridina exterior coordinado al metal y el anillo de imidazol de la histidina 242 del triptófano, situados ambos a una distancia de 3.75 Å. La constante  $K_{sv}$  de interacción con la HSA, calculada experimentalmente resulta ser mayor para el derivado **2c** que para el

derivado **2d**, de modo que la interacción con el anillo de imidazol de la histidina 242 podría estar involucrada en dicha diferencia.

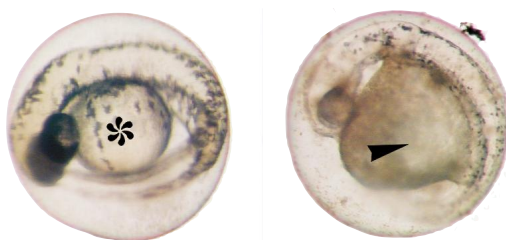
Por otra parte, el Trp 214 está más próximo al compuesto **2d** que al compuesto **2c** y, además, el triptófano en la estructura resultante de interacción con el compuesto **2c** está fuera del entorno donde se aloja el compuesto. Este hecho podría estar implicado en la diferente disminución de la intensidad de fluorescencia cuyos valores experimentales son aproximadamente 40% y 51% para **2c** y **2d**, respectivamente.



#### 4.3.5. Toxicidad *in vivo* en el modelo pez cebra.

El estudio de toxicidad realizado con embriones de pez cebra de los compuestos **2a-2d** los resultados muestran que los compuestos **2a** y **2b** son mucho más tóxicos que los compuestos **2c** y **2d**, siendo el compuesto **2a** menos tóxico ( $10.75 \text{ mg L}^{-1}$ ) que el compuesto **2b** ( $6.02 \text{ mg L}^{-1}$ ), lo que atendiendo a los resultados obtenidos de la actividad citotóxica, la coordinación del ligando fosfina que forma un anillo quelato de 6 miembros proporciona un mejor perfil para el desarrollo de posteriores síntesis.

La gran toxicidad de los compuestos **2a** y **2b** pueden visualizarse mediante los efectos teratogénicos que causan. Por ejemplo con el compuesto **2b** se pudo apreciar que a  $40 \mu\text{M}$  se producen edemas en los embriones y una pigmentación reducida.



*Figura 78. Embriones de 48 hpf. expuestos a un control negativo (Izquierda) y a una concentración  $40 \mu\text{M}$  del compuesto **2b**.*

La exposición del compuesto **2b** a diferentes concentraciones ( $15$ ,  $20$  y  $40 \mu\text{M}$ ), y con embriones de  $96 \text{ hpf}$ , permite apreciar además cambios en la morfología de los embriones tratados con respecto a los embriones control, por ejemplo, la lordosis en los embriones tratados. Además se apreció que a concentraciones superiores a  $10 \mu\text{M}$  los embriones de pez cebra expuestos tienen un eje corporal mas corto.

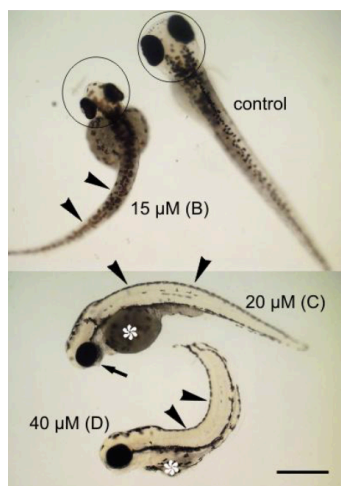


Figura 79. Embriones de 96 hpf. con lordosis (A-D) generadas por el tratamiento con el compuesto **2b**.

Por otra parte, los complejos **2c** y **2d** inducen un retraso en la eclosión de los embriones. Los embriones control eclosionaron entre las 72 y 96 hpf, mientras que los expuestos a dichos complejos eclosionaron a las 120 hpf. Sin embargo, ambas especies no mostraron signos significativos de letalidad en el desarrollo temprano del pez cebra, incluso a concentraciones muy altas (400  $\mu\text{M}$  para el complejo **2c** y 320  $\mu\text{M}$  para el complejo **2d**), lo que supone un resultado determinante en el desarrollo posterior de este perfil estructural ya que *in vitro* se verificó la buena actividad citotóxica de estos compuestos.

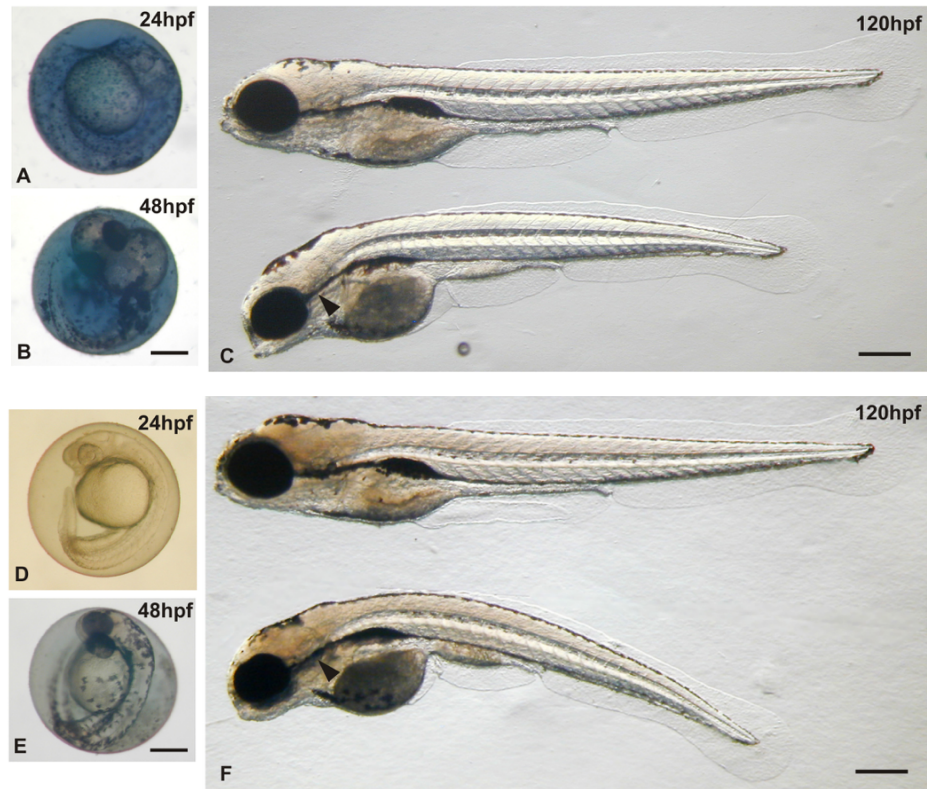


Figura 80. Embriones y larvas de pez cebra utilizados en las pruebas toxicológicas de los complejos complejo 2c (A-C) 2d (D-F). A-B: Embriones a 24 y 48 hpf después de exponerse continuamente a 400  $\mu$ M de solución del complejo 2c. C: Control (arriba) y embrión expuesto a 400  $\mu$ M de complejo 2c (abajo). D-E: embriones a 24 y 48 hpf después de exponerse continuamente a una solución de complejo 320  $\mu$ M 2d. Obsérvese que en 48 hpf, el embrión muestra un patrón normal de pigmentación. F: Control (arriba) y embrión expuesto a 320  $\mu$ M solución de complejo 2d, (abajo). Barras de graduación a 250  $\mu$ m.

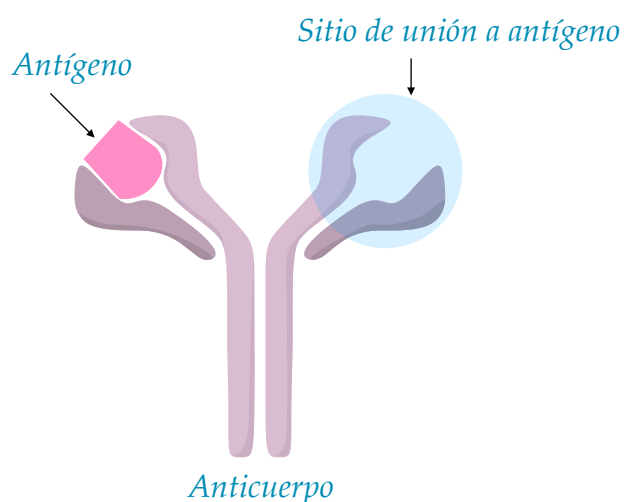
#### 4.3.6. Inmunofluorescencia *in vivo* en el modelo pez cebra.

Debido a que los compuestos **2c** y **2d** no mostraron letalidad en los ensayos de toxicidad realizados con el modelo pez cebra, se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia *in vivo* con dicho modelo empleando embriones de 24 hpf, disoluciones de concentración de 100  $\mu$ M para ambos compuestos y el anticuerpo fosfohistona H3 (**PH3**) que marca la fase M del ciclo celular. El objetivo de este estudio consiste en determinar la influencia en el ciclo celular de los compuestos sobre las células de los embriones empleados dado que, como se expuso con anterioridad, la mayor parte de los fármacos anticancerígenos que se emplean en la actualidad ejercen principalmente su efecto sobre la división celular.

Los métodos inmunoquímicos se basan en una reacción altamente específica y sensible entre un antígeno y un anticuerpo. El antígeno es una sustancia que induce la producción de anticuerpos (proteínas de la clase de inmunoglobulinas) por parte del sistema inmune de un organismo como resultado de una reacción de defensa (inmunidad) a esta sustancia. Los anticuerpos son una gran familia de glicoproteínas que comparten las principales propiedades estructurales y funcionales, caracterizándose por su capacidad para unirse a antígenos, células especializadas y/o proteínas del sistema inmunitario.

Estructuralmente, los anticuerpos se visualizan a menudo como moléculas en forma de Y formadas por cuatro unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño. Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy semejante, es sólo en una pequeña región del extremo de la proteína donde se produce la unión con el antígeno.





*Figura 81. Representación gráfica de la unión entre un antígeno y un anticuerpo.*

En investigación y diagnóstico, los anticuerpos se utilizan como parte de las técnicas inmunohistoquímicas para la identificación y localización de proteínas intra y extracelulares que funcionarán como antígeno.

Un tipo específico de inmunohistoquímica es la inmunofluorescencia, en la cual los anticuerpos empleados están unidos químicamente a una sustancia fluorescente o fluoróforo que, mediante el uso de la microscopía de fluorescencia, permite localizar y cuantificar a nivel celular o subcelular de la molécula diana. Existen dos tipos de técnicas de inmunofluorescencia: primaria (o directa) y secundaria (o indirecta).

La inmunofluorescencia primaria o directa emplea un único anticuerpo para el análisis, mientras que la inmunofluorescencia secundaria o indirecta utiliza dos anticuerpos; el anticuerpo primario que reconoce y se une a la molécula diana y el secundario, marcado con el fluoróforo que reconoce al anticuerpo primario.

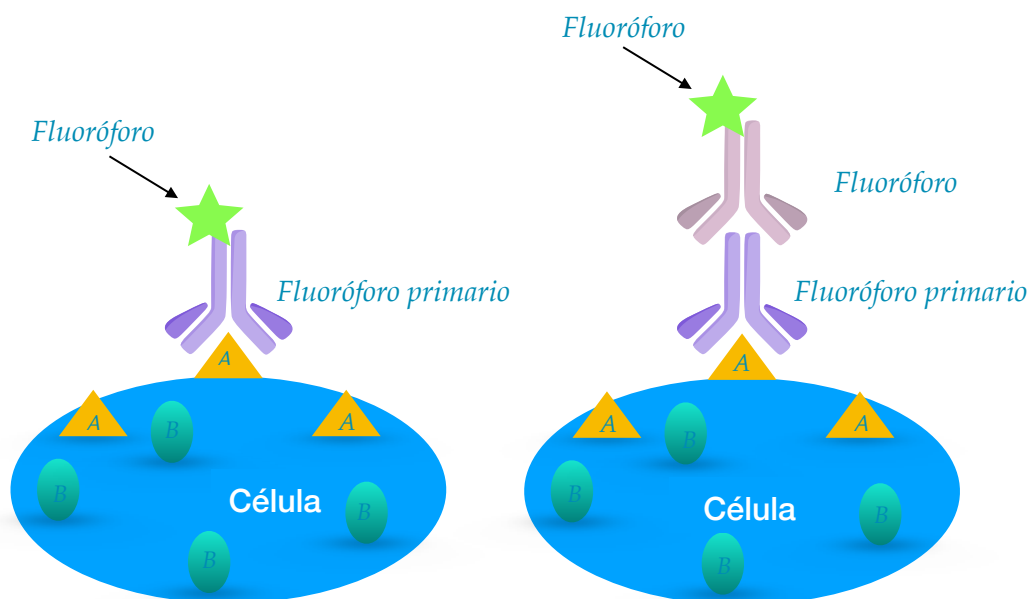
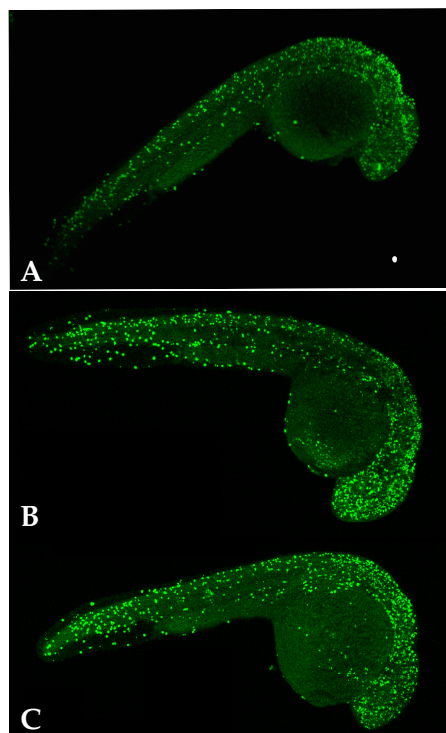


Figura 82. Representación gráfica de la inmunofluorescencia primaria (izquierda) y secundaria.

Además el uso de fluoróforos lleva asociada una limitación debida a la la pérdida de la actividad fluorescente causada por la exposición a la luz, sin embargo esta limitación puede verse compensada por el empleo de fluoróforos más robustos como por ejemplo el fluoróforo Alexa Fluor.

Los resultados obtenidos (figura 83), muestran que los embriones tratados con los compuestos **2c** y **2d** continúan su desarrollo sin que ambos compuestos afecten a dicho desarrollo. Estos resultados confirman que los compuestos **2c** y **2d** no son elevadamente tóxicos, como ya se observó en el ensayo de toxicidad, dado que al parecer no interrumpen considerablemente la proliferación celular. Sin embargo, como los agentes anticancerígenos actúan sobre el ciclo celular se pretende llevar a acabo un ensayo de inmuno fluorescencia con un control positivo para ratificar estos resultados,

ya que éstos sugieren un modo acción cuyo mecanismo pasa por una considerable selectividad hacia las células tumorales.



*Figura 83. Imágenes de inmunofluorescencia empleando el anticuerpo PH3 en embriones de 24 hpf. A) embrión control, B) embrión tratado con 100  $\mu$ M del compuesto 2c, C) embrión tratado con 100  $\mu$ M del compuesto 2d.*



---

# 5. Resultados y Conclusiones.

---

- Se ha llevado a cabo la síntesis con alto rendimiento de nuevos compuestos de coordinación mononucleares y polinucleares derivados de  $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bipy})_2$  y nuevos compuestos organometálicos mononucleares derivados de  $\text{Ru}^{\text{II}}(6\text{-}p\text{-cimen})$ .
- Los compuestos de coordinación de Ru son iónicos, con una geometría octaédrica en el entorno del átomo metálico y fórmula general  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{L})][\text{X}]_2$  (**1a-1j**),  $[\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\}_2(-\text{L})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$  (**1k**) y  $[\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\}_2(-\text{L})\text{Cl}][(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]$  (**1l-1n**).
- Los compuestos organometálicos de Ru son iónicos, con una geometría pseudotetraédrica típica de los derivados semisandwich y fórmula general  $[\text{Ru}(6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L})\text{Cl}][\text{CF}_3\text{SO}_3]$  (**2a-2d**).
- El estudio de la citotoxicidad frente a líneas de cáncer humano evidencia que, mientras que tanto los complejos de Ru precursores como los ligandos adicionados no son activos, mientras que los compuestos de Ru **1a-1n** y **2a-2d** si lo son.
- La citotoxicidad de los compuestos de coordinación mononucleares **1e-1j** es alta. Los compuestos **1e** y **1j** presentan, frente a la línea A2780, un valor de  $\text{IC}_{50}$  ligeramente mayor que el cisplatino y, frente a la línea MCF7, valores ligeramente inferiores.
- Los compuestos de coordinación dinucleares son, por lo general, mucho más activos que los mononucleares. Los compuestos **1l** y **1n** presentan, frente a la línea A2780, un valor de  $\text{IC}_{50}$  ligeramente menor que el cisplatino y, frente a la línea MCF7, valores apreciablemente inferiores.

- Los compuestos organometálicos **2a** y **2b** son más activos que el cisplatino con respecto a la línea A2780, en especial el compuesto **2a**. Los compuestos **2a**, **2b** y **2d** son mucho más activos que el cisplatino frente a la línea MCF7, y también una buena actividad en la línea MDAMB231.
- Los estudios de interacción con ADN como diana biológica indican que los compuestos mononucleares **1b** y **1e** y los compuestos dinucleares **1f-1j** interactúan con el ADN mediante un modo intercalativo, mientras los compuestos mononucleares **1f-1j** lo hacen a través de los surcos del ADN.
- Los estudios de interacción con la albúmina humana como sistema de transporte indican que los compuestos organometálicos **2c** y **2d** interactúan con ella a través del sitio 1.
- Los estudios de mecanismo de muerte celular indican que compuestos mononucleares **1f-1j** y los compuestos dinucleares **1k-1n** inducen la muerte celular tanto por apoptosis como por autofagia.
- La evaluación de la toxicidad in vivo en embriones de peces cebras de los compuestos de coordinación **1f-1n** y organometálicos **2a** y **2b** indica que el compuesto **1g** tiene una toxicidad muy baja ( $LC_{50} = 170 \text{ mg/L}$ ), mientras que los compuestos **1h-1k** presentan una toxicidad moderada ( $LC_{50}$  ca.  $40 \text{ mg/L}$ ), teniendo los restantes una alta toxicidad.

• Un análisis global permite indicar que:

- la incorporación de un segundo átomo de rutenio permite obtener mejores resultados de citotoxicidad, si bien aumenta la letalidad *in vivo*.
- los compuestos organometálicos presentan una gran actividad, sin embargo, llevan consigo una alta toxicidad *in vivo*.
- los compuestos con ligandos fosfina son más activos, pero su menor solubilidad en agua dificulta su estudio biológico.

Por ello, en general, parece que el diseño de nuevos compuestos, sobre todo dinucleares, de alta solubilidad y con ligandos con átomo/s dador/es de fósforo representa una estrategia para conseguir especies de mayor actividad y menor toxicidad.



- Foi realizada a síntese de alto rendimento de novos compostos de coordenação mononucleares e polinucleares  $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bipy})_2$  e novos compostos organometálicos mononucleares derivados de  $\text{Ru}^{\text{II}}(6\text{-}p\text{-cimeno})$ .
- Os compostos de coordenação de Ru são compostos iónicos com geometria octaédrica ao redor do átomo do metal e de fórmula xeral  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{L})][\text{X}]_2$  (**1a-1j**),  $[\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\}_2(\text{-L})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$  (**1k**) y  $[\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\}_2(\text{-L})\text{Cl}][(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]$  (**1l-1n**).
- Os compostos organometálicos de Ru são iónicos, com uma geometria pseudotetraédrica típica dos derivados semisandwich e com fórmula xeral  $[\text{Ru}(6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{L})\text{Cl}][\text{CF}_3\text{SO}_3]$  (**2a-2d**).
- O estudo da citotoxicidade em linhas de câncer humano mostra que tanto os complexos precursores de Ru e os ligandos adicionados não são ativos, enquanto os compostos de Ru **1a-1n** e **2a-2d** são.
- A citotoxicidade dos compostos de coordenação mononuclear **1e-1j** é alta. Os compostos **1e** e **1j** têm um valor de  $\text{IC}_{50}$  ligeiramente superior ao da cisplatina em comparação com a linha A2780 e valores ligeiramente inferiores à linha MCF7.
- Os compostos de coordenação dinuclear são, em geral, muito mais ativos do que os mononucleares. Os compostos **1l** e **1n** apresentam, na linha A2780, um valor de  $\text{IC}_{50}$  ligeiramente inferior ao da cisplatina e, em comparação com a linha MCF7, valores sensivelmente mais baixos.
- Os compostos organometálicos **2a** e **2b** são mais activos que a cisplatina em relação à linha A2780, especialmente o composto **2a**. Os compostos **2a**, **2b** e **2d** são muito mais

ativos do que a cisplatina na linha MCF7, e também apresentam boa atividade na linha MDAMB231.

- Os estudos de interação do DNA como alvo biológico indicam que os compostos mononucleares **1b** e **1e** e, os compostos dinucleares **1f-1j**, interagem com o DNA por intercalação, enquanto que os compostos mononucleares **1f-1j** fazem isso através dos sulcos de DNA.
- Os estudos de interação com albumina humana como sistema de transporte indicam que os compostos organometálicos **2c** e **2d** interagem com ela através do site 1.
- Os Estudos do mecanismo de morte celular indicam que os compostos mononucleares **1f-1j** e os compostos dinucleares **1k-1n** induzem a morte celular por apoptose e por autofagia.
- A avaliação da toxicidade *in vivo* em embriões de peixe-zebra dos de coordenação **1f-1n** e dos compostos organometálicos **2a** e **2b** indica que o composto **1g** tem uma toxicidade muito baixa ( $LC_{50} = 170 \text{ mg / L}$ ), enquanto os compostos **1h- 1k** têm uma toxicidade moderada ( $LC_{50}$ , cerca de  $40 \text{ mg / L}$ ), sendo os restantes mais tóxicas.

•§ Uma análise geral indica que:

- a incorporação de um segundo átomo de rutênio permite melhores resultados de citotoxicidade, embora a letalidade in vivo aumenta.
- compostos organometálicos apresentam alta atividade, no entanto, eles apresentam alta toxicidade in vivo.
- os compostos com ligandos de fosfina são mais ativos, mas sua menor solubilidade em água dificulta o seu estudo biológico.

Portanto, em geral, parece que o design de novos compostos, especialmente dinuclear, alta solubilidade e ligandos com doador de fósforo / é uma estratégia para alcançar espécies de maior atividade e menor toxicidade.



## 6. Anexos.

## Anexo I.

	<b>1b</b>	<b>1c</b>
Fórmula	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> Cl <sub>6</sub> F <sub>6</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> RuS <sub>2</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>3.50</sub> F <sub>6</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> RuS <sub>2</sub>
Peso fórmula	1276.71	1097.96
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	PI	P2 <sub>1</sub> /c
Dimensiones de la celda unidad	a / Å = 8.8661(4)	a / Å = 10.6249(5)
	b / Å = 10.7299(5)	b / Å = 30.0154(15)
	c / Å = 27.3438(12)	c / Å = 13.3630(6)
	$\alpha$ / ° = 87.978(2)	$\alpha$ / ° =
	$\beta$ / ° = 88.240(3)	$\beta$ / ° = 99.026(3)
	$\gamma$ / ° = 79.568(2)	$\gamma$ / ° =
Volumen / Å <sup>3</sup>	2555.9(2)	4208.8(3)
Z	2	4
Coefficiente de absorción / mm <sup>-1</sup>	780	779
Tamaño del cristal / mm <sup>3</sup>	0.18 x 0.11 x 0.05	0.38 x 0.13 x 0.03
Rango $\theta$ para la adquisición de datos	1.49 a 26.49	1.36 a 26.54
Reflexiones recogidas	67107	97515
Reflexiones independientes	R <sub>int</sub> = 0.0859	R <sub>int</sub> = 0.1030
R <sub>1</sub> [I > 2(I)]	0.0611	0.0818
wR <sub>2</sub> (todos los datos)	0.1750	0.2507

Tabla 16. Datos cristalográficos de los compuestos **1b** y **1c**.

	<b>1e</b>	<b>1g</b>
Fórmula	C <sub>35</sub> H <sub>25</sub> F <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> RuS <sub>3</sub>	C <sub>43</sub> H <sub>39</sub> F <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> PRuS <sub>2</sub>
Peso fórmula	922.85	1061.96
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /n	C2/c
Dimensiones de la celda unidad	a / Å = 8.1768(3)	a / Å = 16.700(2)
	b / Å = 42.1354(14)	b / Å = 17.633(2)
	c / Å = 10.4715(3)	c / Å = 30.174(4)
	$\alpha$ / ° = 87.978(2)	$\alpha$ / ° =
	$\beta$ / ° = 95.711(2)	$\beta$ / ° = 100.816(5)
	$\gamma$ / ° =	$\gamma$ / ° =
Volumen / Å <sup>3</sup>	3589.9(2)	8728(2)
Z	4	8
Coeficiente de absorción / mm <sup>-1</sup>	0.697	0.576
Rango $\theta$ para la adquisición de datos	0.97 a 26.45	2.03 a 28.1
Reflexiones recogidas	72423	132877
Reflexiones independientes	R <sub>int</sub> = 0.0356	R <sub>int</sub> = 0.0439
R <sub>1</sub> [I > 2(I)]	0.0234	0.0293
wR <sub>2</sub> (todos los datos)	0.0800	0.0833

Tabla 17. Datos cristalográficos de los compuestos **1e** y **1g**.

	<b>1h</b>	<b>1i</b>
Fórmula	C <sub>48</sub> H <sub>41</sub> AsF <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6.5</sub> PRuS <sub>2</sub>	C <sub>57</sub> H <sub>47</sub> F <sub>6</sub> FeN <sub>4</sub> O <sub>6.5</sub> P <sub>2</sub> RuS <sub>2</sub>
Peso fórmula	1162.93	1288.97
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /c	P2 <sub>1</sub>
Dimensiones de la celda unidad	a / Å = 21.780(1)	a / Å = 14.050(6)
	b / Å = 10.914(1)	b / Å = 23.030(5)
	c / Å = 20.652(1)	c / Å = 16.094(4)
	$\alpha / ^\circ =$	$\alpha / ^\circ =$
	$\beta / ^\circ = 105.397(2)$	$\beta / ^\circ = 90.751(5)$
	$\gamma / ^\circ =$	$\gamma / ^\circ =$
Volumen / Å <sup>3</sup>	4732 (1)	5207(3)
Z	4	4
Coeficiente de absorción /mm <sup>-1</sup>	1.226	0.791
Rango $\theta$ para la adquisición de datos	0.97 a 25.27	1.27 a 28.28
Reflexiones recogidas	107212	234059
Reflexiones independientes	R <sub>int</sub> = 0.0488	R <sub>int</sub> = 0.0701
R <sub>1</sub> [I > 2(I)]	0.0271	0.0297
wR <sub>2</sub> (todos los datos)	0.0643	0.0672

Tabla 18. Datos cristalográficos de los compuestos **1h** y **1i**.



	<b>1j</b>	<b>1k</b>
Fórmula	C <sub>52</sub> H <sub>46</sub> Cl <sub>4</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> P <sub>2</sub> RuS <sub>2</sub>	C <sub>68</sub> H <sub>64</sub> F <sub>12</sub> N <sub>14</sub> O <sub>16</sub> Ru <sub>2</sub> S <sub>4</sub>
Peso fórmula	1305.86	1891.71
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	C2/c	PI
Dimensiones de la celda unidad	a / Å= 43.348(6)	a / Å= 11.645(6)
	b / Å= 11.488(1)	b / Å= 12.310(5)
	c / Å= 22.260(3)	c / Å= 16.014(7)
	$\alpha$ / °=	$\alpha$ / °= 102.226(6)
	$\beta$ / °= 99.94(2)	$\beta$ / °= 100.816(5)
	$\gamma$ / °=	$\gamma$ / °= 99.707(7)
Volumen / Å <sup>3</sup>	10 919(2)	2112(2)
Z	8	1
Coeficiente de absorción /mm <sup>-1</sup>	0. 692	0. 551
Rango $\theta$ para la adquisición de datos	2.02 a 25.00	1.36 a 23.25
Reflexiones recogidas	92550	40196
Reflexiones independientes	R <sub>int</sub> = 0.205	R <sub>int</sub> = 0.1145
R <sub>1</sub> [I>2(I)]	0.0601	0.0499
wR <sub>2</sub> (todos los datos)	0.1610	0.1179

Tabla 19. Datos cristalográficos de los compuestos **1j** y **1k**.

	<b>1l</b>	<b>1n</b>
Fórmula	$C_{68}H_{60}AsCl_2F_6N_8O_7PRu_2S_2$	$C_{78}H_{64}Cl_2F_6FeN_8O_{75}P_2Ru_2S_2$
Peso fórmula	1658.29	1794.32
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	PI	C2/m
Dimensiones de la celda unidad	a / Å = 9.898(6)	a / Å = 20.714(4)
	b / Å = 12.644(7)	b / Å = 26.059(5)
	c / Å = 15.696(9)	c / Å = 19.238(4)
	$\alpha / ^\circ = 70.926(4)$	$\alpha / ^\circ = 113.748(1)$
	$\beta / ^\circ = 74.705(5)$	$\beta / ^\circ = 100.816(5)$
	$\gamma / ^\circ = 68.738(7)$	$\gamma / ^\circ =$
Volumen / Å <sup>3</sup>	1706(2)	9505(3)
Z	1	4
Coeficiente de absorción / mm <sup>-1</sup>	1.163	0.658
Rango $\theta$ para la adquisición de datos	2.53 a 26.44	1.16 a 24.71
Reflexiones recogidas	20016	94466
Reflexiones independientes	$R_{int} = 0.0528$	$R_{int} = 0.1904$
$R_1[I > 2(I)]$	0.0469	0.0672
$wR_2$ (todos los datos)	0.1277	0.2066

Tabla 20. Datos cristalográficos de los compuestos **1l** y **1n**.

	<b>2a</b>	<b>2b</b>
Fórmula	C <sub>40</sub> H <sub>42</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>3</sub> O <sub>3</sub> P <sub>2</sub> RuS	C <sub>37</sub> H <sub>37</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>3.50</sub> P <sub>2</sub> RuS
Peso fórmula	929.16	825.19
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P-1	P2 <sub>1</sub> /n
Dimensiones de la celda unidad	a / Å = 11.825(7)	a / Å = 11.514(6)
	b / Å = 12.103(9)	b / Å = 10.559(7)
	c / Å = 15.847(4)	c / Å = 28.951(8)
	α / ° = 107.788(7)	α / ° =
	β / ° = 107.421(9)	β / ° = 91.978(9)
	γ / ° = 95.574(9)	γ / ° =
Volumen / Å <sup>3</sup>	1987(2)	3518(3)
Z	2	4
Coeficiente de absorción / mm <sup>-1</sup>	0.782	0.658
Rango θ para la adquisición de datos	1.45 a 28.36	1.88 a 30.65
Reflexiones recogidas	154955	116429
Reflexiones independientes	R <sub>int</sub> = 0.0289	R <sub>int</sub> = 0.0374
R <sub>1</sub> [I > 2(I)]	0.0275	0.0230
wR <sub>2</sub> (todos los datos)	0.0855	0.0739

Tabla 21. Datos cristalográficos de los compuestos **2a** y **2b**.

<b>2d</b>	
Fórmula	C <sub>31</sub> H <sub>30</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> RuS
Peso fórmula	732.17
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /n
Dimensiones de la celda unidad	a / Å = 13.179(4)
	b / Å = 7.952(6)
	c / Å = 28.727(5)
	$\alpha$ / ° =
	$\beta$ / ° = 96.379(8)
Volumen / Å <sup>3</sup>	$\gamma$ / ° =
	2992(2)
Z	4
Coefficiente de absorción / mm <sup>-1</sup>	0.743
Rango $\theta$ para la adquisición de datos	1.43 a 25.38
Reflexiones recogidas	57247
Reflexiones independientes	R <sub>int</sub> = 0.0452
R <sub>1</sub> [I > 2(I)]	0.0310
wR <sub>2</sub> (todos los datos)	0.0899

Tabla 22. Datos cristalográficos de los compuestos **2d**.

Distancias	1b	1c	1e
Ru(1)-N(1)	2.067(4)	2.038(6)	2.120(16)
Ru(1)-N(2)	2.065(4)	2.058(6)	2.044(16)
Ru(1)-N(3)	2.048(4)	2.062(5)	2.064(17)
Ru(1)-N(4)	2.049(4)	2.057(6)	2.045(16)
Ru(1)-N(5)	2.056(4)	2.062(5)	2.074(16)
Ru(1)-N(8)	2.035(4)	2.047(6)	2.349(5)
Ru(1)-S(1)			2.3494(5)
Ángulos			
N(8)-Ru(1)-N(3)	99.26(16)	96.0(2)	
N(8)-Ru(1)-N(4)	94.57(15)	97.4(2)	
N(3)-Ru(1)-N(4)	96.40(15)	95.1(2)	96.59(6)
N(8)-Ru(1)-N(5)	86.35(16)	90.2(2)	
N(3)-Ru(1)-N(5)	173.11(16)	171.7(2)	174.05(6)
N(4)-Ru(1)-N(5)	79.06(15)	78.5(2)	78.68(6)
N(8)-Ru(1)-N(2)	172.92(15)	174.3(2)	
N(3)-Ru(1)-N(2)	78.35(16)	78.8(2)	78.98(7)
N(4)-Ru(1)-N(2)	92.33(15)	85.5(2)	89.57(6)
N(5)-Ru(1)-N(2)	96.54(16)	95.3(2)	97.25(6)
N(8)-Ru(1)-N(1)	79.03(15)	78.0(2)	
N(3)-Ru(1)-N(1)	88.63(15)	89.7(2)	87.00(6)
N(4)-Ru(1)-N(1)	172.46(16)	173.7(2)	175.67(6)
N(5)-Ru(1)-N(1)	96.41(15)	97.1(2)	97.87(6)
N(2)-Ru(1)-N(1)	94.19(15)	99.5(2)	93.50(6)
N(3)-Ru(1)-S(1)			95.97(5)
N(4)-Ru(1)-S(1)			95.89(5)
N(5)-Ru(1)-S(1)			88.17(5)
N(2)-Ru(1)-S(1)			172.99(5)
N(1)-Ru(1)-S(1)			81.30(5)

Tabla 23. Distancias y ángulos seleccionados para los cristales de **1b**, **1c**, **1e**.

## Anexo II.

Distancias	1g	1h	1i	1j
Ru(1)-N(1)	2.084(2)	2.087(2)	2.100(3)	2.077(5)
Ru(1)-N(2)	2.117(2)	2.109(2)	2.094(3)	2.126(5)
Ru(1)-N(3)	2.071(2)	2.079(2)	2.091(3)	2.081(5)
Ru(1)-N(4)	2.070(2)	2.117(2)	2.093(3)	2.115(5)
Ru(1)-N(5)	2.056(4)			
Ru(1)-P(1)	2.306(2)	2.352(17)	2.411(2)	2.335(2)
Ru(1)-As(1)		2.363(6)		
Ru(1)-P(2)		2.422(19)	2.424(1)	2.337(2)
Ru(1)-As(2)		2.368(9)		
Ángulos				
N(1)-Ru(1)-N(2)	78.06(6)	78.11(8)	77.7(2)	77.7(2)
N(3)-Ru(1)-N(4)	78.76(6)	78.22(8)	78.0(2)	77.7(2)
P(1)-Ru(1)-N(5)	88.20(4)			
P(1)-Ru(1)-As(1)		83.6(4)		
P(1)-Ru(1)-P2(1)			99.80(3)	95.76(6)
N(2)-Ru(1)-P(1)	177.01(4)	179.9(4)	172.01(9)	170.01(13)
N(4)-Ru(1)-P(2)			169.32(9)	172.49(14)
N(1)-Ru(1)-N(3)	167.70(6)	169.79(8)	169.02(12)	173.45(19)
N(4)-Ru(1)-N(5)	176.06(6)			
N(4)-Ru(1)-As(1)		176.53(14)		

Tabla 24. Distancias y ángulos seleccionados para los cristales de **1g-1j**.

Distancias	1k	1l	1n
Ru(1)-N(1)	2.057(4)	2.048(3)	2.062(6)
Ru(1)-N(2)	2.085(4)	2.056(3)	2.084(6)
Ru(1)-N(3)	2.051(4)	2.097(3)	2.061(6)
Ru(1)-N(4)	2.063(4)	2.072(3)	2.056(6)
Ru(1)-N(5)	2.060(4)		
Ru(1)-N(6)	1.972(4)		
Ru(1)-P(1)		2.377(2)	2.312(2)
Ru(1)-As(1)		2.377(2)	
Ru(1)-Cl(1)		2.431(2)	2.434(2)
Ángulos			
N(1)-Ru(1)-N(2)	79.1(2)	78.8(1)	79.5(2)
N(3)-Ru(1)-N(4)	78.6(2)	77.6(1)	78.6(3)
N(5)-Ru(1)-N(6)	79.3(2)		
Cl(1)-Ru(1)-P(1)		87.50(3)	88.54(6)
N(2)-Ru(1)-N(6)	172.1(2)		172.01(9)
N(2)-Ru(1)-P(1)			174.7(2)
N(3)-Ru(1)-P(1)			169.32(9)
N(2)-Ru(1)-N(4)		169.7(1)	
N(1)-Ru(1)-Cl(1)		169.9(1)	
N(4)-Ru(1)-Cl(1)		174.1(1)	170.6(2)
N(1)-Ru(1)-N(4)	168.8(2)		169.02(12)
N(3)-Ru(1)-N(5)	173.1(2)		

Tabla 25. Distancias y ángulos seleccionados para los cristales de **1k**, **1l** y **1n**.

Distancias	2a	2b	2d
Ru(1)-Cl(1)	2.386(1)	2.388(1)	2.396(2)
Ru(1)-P(1)	2.320(1)	2.311(1)	
Ru(1)-P(2)	2.329(1)	2.320(1)	
Ru(1)-N(1)			2.059(2)
Ru(1)-N(3)			2.083(2)
C(1)-C(2)		1.333(2)	
C(2)-C(4)	1.331(3)		
Ángulos			
P(1)-Ru(1)-P(2)	90.59(5)	72.37(3)	
N(1)-Ru(1)-N(3)			76.03(9)
P(1)-Ru(1)-Cl(1)	83.00(3)	83.63(3)	
P(2)-Ru(1)-Cl(1)	84.08(4)	83.74(4)	
N(1)-Ru(1)-Cl(1)			86.61(7)
N(3)-Ru(1)-Cl(1)			85.93(7)

Tabla 26. Distancias y ángulos seleccionados para los cristales de **2a**, **2b**, **2d**.



## Anexo III

Complejo	$E_{pa}$ (V)	$E_{pc}$ (V)	$E_{1/2}$ (V)	$E_{pa} - E_{pc}$ (mV)	$I_{pc}/I_{pa}$
1a	1.58	1.49	1.54	90	1.0
	-0.83	-0.94		110	0.4
	-1.38	-1.47		90	0.4
1b	1.56	1.48	1.52	80	0.9
	-0.96				
	-1.42	-1.54			
1c	1.67				
		-0.58			
		-0.98			
1d	1.60	1.50	1.55	100	1.0
	-1.16	-1.25	-1.21	90	0.9

Tabla 27. Datos electroquímicos de los compuestos **1a-1d** en diclorometano.

Complejo	$E_{pa}$ (V)	$E_{pc}$ (V)	$E_{1/2}$ (V)	$E_{pa} - E_{pc}$ (mV)	$I_{pc}/I_{pa}$
1a	1.45	1.36	1.41	90	1.0
	-0.98	-0.92	-0.95	60	0.9
	-1.41	-1.52	-1.47	110	0.9
	-1.65	-1.75	-1.70	100	0.9
1b	1.44	1.33	1.39	110	0.9
	-1.00	-0.92	-0.96	80	0.7
	-1.43	-1.52	-1.48	90	0.8
	-1.67	-1.78	-1.73	110	0.9
1c	1.49	1.39	1.44	100	1.0
	-0.97	-1.05	-1.01	80	0.8
	-1.39	-1.50	-1.44	110	0.8
	-1.62	-1.71	-1.67	90	1.0
1d	1.32	1.23	1.28	90	1.0
	-1.35	-1.46	-1.41	110	0.7
	-1.54	-1.66	-1.61	110	1.0

Tabla 28. Datos electroquímicos de los compuestos **1a-1d** en Acetonitrilo.

Complejo	E <sub>pa</sub> (V)	E <sub>pc</sub> (V)	E <sub>1/2</sub> (V)	E <sub>pa</sub> – E <sub>pc</sub> (mV)	I <sub>pc</sub> /I <sub>pa</sub>
2a	2.00	1.82			
	-	1.03			
	-	0.84			
	-	0.19			
	-	-1.04			
2b	1.62	1.46			
	-	0.80			
	-	-1.31			
2d	1.86	1.75	1.805	110	0.5
	-	-0.81	-	-	-

Tabla 29. Datos electroquímicos de los compuestos **2a-2d** en diclorometano.

Complejo	E <sub>pa</sub> (V)	E <sub>pc</sub> (V)	E <sub>1/2</sub> (V)	E <sub>pa</sub> – E <sub>pc</sub> (mV)	I <sub>pc</sub> /I <sub>pa</sub>
1a	1.75	1.66	1.705	90	0.8
		1.29			
	1.19				
		-1.22			
1b	1.67	1.27			
		-1.21			
1c	0.63	0.56	0.595	70	1.0
	-1.24	-1.35	-1.295	110	1.0
1d	1.86		1.55	100	1.0
		1.21	-1.21	90	0.9
		-0.68			
	-0.46				

Tabla 30. Datos electroquímicos de los compuestos **2a-2d** en acetonitrilo.